

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
Direction : Professeur P. Hauduroy

Yale Medical Library

Les collections microbiennes

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de Docteur en médecine

par

Paul ANEX

Médecin diplômé de la Confédération Suisse

YVERDON

Imprimerie de la Société du Journal d'Yverdon

1947

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DE MÉDECINE
INSTITUT D'HYGIÈNE ET DE BACTÉRIOLOGIE
Direction : Professeur P. Hauduroy

Les collections microbiennes

THÈSE

présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de Docteur en médecine

par

Paul ANEX

Médecin diplômé de la Confédération Suisse

YVERDON

Imprimerie de la Société du Journal d'Yverdon

1947

Université de Lausanne

Faculté de Médecine

Le Conseil de la faculté de médecine de l'Université de Lausanne, après avoir pris connaissance des rapports favorables de MM. les professeurs Hauduroy et Thélin et sans se prononcer sur les opinions du candidat, autorise l'impression de la thèse intitulée :

« LES COLLECTIONS MICROBIENNES »

présentée par Monsieur Paul ANEX pour l'obtention du grade de Docteur en médecine.

Lausanne, le 13 octobre 1947.

*Le Doyen :
Prof. P. DECKER.*

Que M. le Professeur Hauduroy veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude la plus profonde pour son accueil bienveillant et pour la confiance qu'il nous a témoignée : ses conseils précieux et ses directives judicieuses nous ont grandement facilité la tâche et nous ont permis de mener à bien ce travail tant pratiquement que théoriquement.

Nous tenons à remercier aussi l'Académie suisse des Sciences médicales qui, par sa compréhension, a permis la création du « Centre de collections de types microbiens » de Lausanne où nous avons eu l'honneur de faire ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153514_0042

Les collections microbiennes

Le Centre de Collections de Types Microbiens
de Lausanne

INTRODUCTION

La microbiologie s'est développée à partir des travaux de Pasteur et de Koch avec une rapidité telle que son importance est aujourd'hui reconnue dans les domaines les plus divers de l'activité humaine.

Avec cette extension constante, la découverte incessante de germes nouveaux, la complexité des problèmes soulevés, la multiplication des techniques, le besoin croissant d'une systématique sûre des bactéries et l'application pratique de plus en plus étendue des données nouvelles, la nécessité s'est très tôt fait sentir de créer des organismes chargés de conserver les bactéries et de réunir la documentation les concernant. Des auteurs nombreux : Duclaux, Macé, Wassermann et bien d'autres expriment déjà à la fin du siècle dernier le vœu de voir cette œuvre se réaliser et insistent sur l'aide considérable qu'elle apporterait aux chercheurs.

L'utilité d'un musée bactériologique vivant n'a fait que grandir avec le nombre des travailleurs, la profusion des travaux et la multiplication des laboratoires de recherches. Diverses institutions importantes dont les services furent et sont encore très appréciées virent le jour dans plusieurs pays ; leur renom s'est étendu aujourd'hui dans le monde entier : je me bornerai à citer l'Institut Pasteur à Paris, l'Institut Lister de Londres, l'American Type Culture Collection à Washington et le Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn en Hollande. Toutes ces institutions s'efforcent de mettre à la disposition des chercheurs le plus grand nombre de germes, mais il est impossible à une seule d'entre elles de conserver toutes les bactéries, tous les virus, toutes les moisissures connus et dont peuvent avoir besoin les laboratoires scientifiques ou industriels.

C'est pourquoi, dans le but de faire connaître aux spécialistes du monde entier les possibilités des diverses collections, plusieurs auteurs ont pensé que la création d'un centre de collections permettant de coordonner toutes les données, de tenir à jour un catalogue des souches disponibles et d'en diffuser la descriptions, contribuerait à simplifier la tâche des chercheurs,

leur donnerait un précieux instrument de travail, éviterait un gaspillage énorme de temps et d'efforts et aiderait de façon efficace à l'avancement de la science bactériologique dont, œuvre perpétuellement à jour, vivante et mobile, elle refléterait les transformations à tout point de vue.

C'est à un historique rapide des collections existantes, à la création du Centre de Collection de Types Microbiens de Lausanne, à son but, à ses relations, à ses moyens techniques et surtout à l'étude des moyens de conservation des bactéries qu'est consacré ce travail.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE ET RÉALISATION RÉCENTE

Au début de ce siècle, les principales sources de germes auxquelles s'adressaient les microbiologistes n'étaient pas très nombreuses.

Il existait en Europe la Collection de « l'Institut Pasteur de Paris », constituée depuis de nombreuses années déjà et la Collection « Kral » à Vienne. Puis, à part ces collections d'intérêt général, on trouvait en outre d'autres collections, spécialisées dans la conservation de germes particuliers, telles que le « Centraalbureau voor Schimmelcultures » de Baarn en Hollande, le « Laboratorium voor Microbiologie » à Delft, la « Collection du Carlsberg Laboratorium de Valby », près de Copenhague, qui s'occupait spécialement des levures et la collection de « l'Institut für Gärungsgewerbe » à Berlin dont l'intérêt se portait surtout sur les fermentations industrielles. Sous la pression de conditions économiques défavorables, les collections Kral de Vienne et Carlsberg de Valby durent renoncer à leur activité.

En Amérique, la « Collection de l'American Museum of Natural History » de New-York constituait le seul centre important à la disposition des chercheurs du Nouveau Monde.

Peu après la première guerre mondiale de nouvelles collections se créent et prennent rapidement de l'extension et de l'importance, tandis que les anciennes étendent leur activité.

En Angleterre en 1920, la « National Collection of Types Cultures » prend naissance sous le contrôle du Medical Research Council et du Lister Institute of Preventive Medicine, qui, depuis longtemps, désiraient la création d'une telle collection d'où les microbiologistes en général et les bactériologistes en particulier pourraient obtenir des souches de germes d'une provenance sûre pour leurs recherches. Dès le début de son activité, le succès de la collection est assuré, puisque la première année déjà 1500

cultures sont mises à la disposition des chercheurs. Ce nombre ne cesse de croître d'année en année pour atteindre en 1939, un total de 6400 souches, dont 45 % sont destinés à des buts scientifiques, 20 % à des collèges et des universités pour l'enseignement, et 35 % pour le domaine technique et pratique. Cette collection fut transférée dès le début de la dernière guerre à Elstree, Herst, et put continuer son activité grâce aux efforts de son chef, le Dr R. St. John-Brooks qui, lors du dernier Congrès du Conseil scientifique du Centre de Collection de Types Microbiens à Lausanne, ne manqua pas de nous faire part des craintes qu'il avait éprouvées pendant ces dernières années difficiles. Cette collection, constituée au début par la collection privée de l'Institut Lister, par la collection de clostridies du Dr Muriel Robertson, par des moisissures de Sir Arthur Harden et les souches de *Salmonella* de Schütze, s'est largement enrichie au cours des années et a acquis récemment les microorganismes utilisés pour l'étude de la pénicilline, de la pyroxydine, de l'acide folique, de l'acide pantothénique, de l'acide nicotinique, de la thiamine et de la riboflavine ainsi que les souches de clostridies du Dr Gale (Cambridge, Dept. of Biochemistry) utilisés pour la recherche de l'ornithine, de l'histidine et de l'acide glutamique. D'autres souches telles que les *Actinomyces*, producteurs de streptomycine et de streptothricine, font de cette collection l'une des plus complètes à l'heure actuelle.

« L'Institut Pasteur » de Paris ne possède pas de collection centrale, mais chacun de ses services en possède une : le Dr Prévot, chef du service des anaérobies, possède plus de 600 souches ; le Dr Lépine, chef du service des virus, conserve les principaux d'entre eux, tandis que le Dr Langeron, chef du Laboratoire de Cryptogamie de la Faculté de Médecine de Paris, qui a eu le malheur de perdre sa collection lors des journées sombres de l'exode de 1940, s'efforce actuellement de la reconstituer et de l'agrandir. A Paris encore la « Mycothèque du Laboratoire de Cryptogamie du Museum » possède plus de 500 souches de champignons microscopiques.

En Hollande, le « Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn », fondé en 1906 par l'Association internationale des Botanistes, sous la direction du Professeur Went d'Utrecht, prit naissance à partir d'une collection de champignons provenant de Java. En 1907, il passa sous la direction de Mademoiselle Westerdijk qui, par son activité inlassable, ne tarda pas à en faire un centre très important et réussit à le maintenir intact durant la dernière guerre malgré des moyens très limités. Son activité s'étend aussi au domaine des levures et des bactéries d'intérêt économique grâce à sa collaboration avec le « Laboratorium voor Microbiologie des Technische Hoogeschool de Delft ». Cette vaste collection, la plus riche existant actuellement pour les

moisissures, compte plus de 6500 souches, y compris 600 souches de levures de Delft.

Nous ignorons de ce qu'il est advenu de la collection de l'Institut Koch de Berlin, mais plusieurs souches qui en provenaient, déjà distribuées avant la guerre, ont pu être conservées : par exemple la souche originale de *Mycobacterium tuberculosis* de Koch, entretenue aux U.S.A.

« L'American Type Culture Collection », fondée en 1911 sous le nom de « Bacteriological Collection and Bureau of the Distribution of Bacterial Cultures » sous la direction de Winslow, a été transférée en 1922 au « Army Medical Museum » de Washington, puis au « John Mc Cormick Institute » à Chicago et enfin à Washington, à l'« Ecole de Médecine de l'Université Georgetown » sous la direction du professeur Maric Mollari qui en est encore le directeur. Riche de plus de 3000 germes, elle distribue annuellement plus de 4000 souches.

En Amérique du Sud, il importe de citer la collection de champignons microscopiques de Rio de Janeiro, à l'« Institut Oswaldo Cruz » et que dirige le Dr O. da Fonseca.

Une collection peu importante, mais qui rendit de nombreux services pendant quelques années, après la première guerre mondiale, existait dans les laboratoires du « South Manchurian Railway » à Darien. N'oublions pas pour terminer l'importante collection chinoise du « Bureau National de Recherches Industrielles » à Chungking.

Nous ne citerons pas les collections des nombreux instituts de bactériologie, des laboratoires officiels ou privés, dont la liste serait infinie. La plupart d'entre eux possède quelques dizaines ou centaines de souches, mais aucun d'eux n'est organisé pour répondre aux besoins croissants d'une science qui ne cesse de se développer. Cette revue rapide des principales collections existant dans le monde permet de réaliser l'importance qu'elles ont acquise, le nombre des services qu'elles ne cessent de rendre aux chercheurs, quoique l'activité de la plupart d'entre elles n'ait que peu ou pas dépassé le cadre national.

Cette absence de coordination entre les différentes spécialités dont elles s'occupent n'a pas échappé à l'attention de nombreux savants, surtout lors des congrès qui, s'ils créaient des contacts personnels utiles, laissaient voir souvent le faible développement des contacts techniques pratiques et intéressants. C'est pour remédier à cet état de chose que furent envisagées, lors du premier congrès de Microbiologie de Paris en 1930, des mesures destinées à faciliter une vaste et utile extension des principales collections de germes existantes. Le congrès prit une résolution insistant sur le rôle important dévolu aux collections microbiennes dans l'établissement d'une nomenclature et d'une classification claires, insistant aussi sur la nécessité d'étendre

la coopération et la coordination de ces diverses institutions pour servir au mieux la bactériologie aussi bien dans le domaine théorique, médical qu'économique.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Le développement complet de ces collections microbiennes fut toujours limité par la faiblesse des moyens financiers, le plus souvent très restreints. Aujourd'hui, vu l'extension toujours croissante des connaissances dans les différentes branches de la microbiologie, il devient difficile de maintenir des collections complètes si de larges moyens ne sont pas mis à leur disposition. Le nombre des spécialistes doit être suffisant, de même que les laboratoires et le matériel nécessaires. On se rend compte en 1930 déjà de la nécessité de partager cet immense travail, de confier les groupes divers de microorganismes à des experts en la matière.

Les années qui suivent le congrès de 1930 permettent à cette idée de coordination de prendre forme et de se préciser, plusieurs articles apportent des suggestions intéressantes, mais la deuxième guerre mondiale va mettre en veilleuse tous ces efforts, qui n'en cessent pas moins de développer leurs effets. En 1942 particulièrement, Buchanan de l'« American Type Culture Collection » et St. John-Brooks de la « National Collection of Type Cultures » de Londres proposent un certain nombre de suggestions qu'il est intéressant de parcourir (18). Pour ces deux auteurs, il importe de créer des collections permanentes et sûres d'organismes vivants, comprenant des bactéries, des protozoaires, des champignons et des algues microscopiques, de même que des virus, spécialement ceux dont l'importance est manifeste au point de vue médical, vétérinaire, agricole et industriel, de manière à répondre plus efficacement aux besoins des divers chercheurs s'occupant de biologie fondamentale, de génétique, de physiologie cellulaire et de biochimie. Il est nécessaire en outre d'étendre l'utilité de ces collections aux régions qui n'en possèdent pas ou qui ne peuvent encore en bénéficier de façon utile, et de diffuser par une large coordination les données nouvelles et intéressantes.

Un tel organisme, chargé de diffuser les souches microbiennes, les observations s'y rapportant et tous les renseignements utiles aux chercheurs du monde entier, ne peut remplir son rôle qu'après l'établissement d'un accord entre les diverses institutions nationales existant déjà. Sous les auspices de l'« Association internationale des Microbiologistes », divers contacts utiles s'établirent entre savants de plusieurs pays et permirent à l'idée d'un centre de collection de se propager et

de trouver un accueil favorable chez la plupart des microbiologistes.

En songeant à la création et au développement possible d'un tel centre, on entrevoit d'emblée deux possibilités : la première serait celle d'une collection centrale, très complète, mais elle présente de telles difficultés administratives et techniques vu le nombre énorme des germes à conserver et la multiplicité des méthodes d'investigations à utiliser qu'elle doit être écartée. Aucun laboratoire actuel ne peut songer à entreprendre une telle œuvre à moins de disposer de fonds considérables, de trouver le personnel nécessaire et capable de mener à bien une tâche aussi complexe. Toutefois, malgré son caractère utopique, l'idée d'une vaste collection centralisée n'en présente pas moins un intérêt certain. L'autre possibilité, beaucoup plus réalisable et immédiatement applicable, consiste en une large décentralisation du travail. Les laboratoires spécialisés, déjà existants, seraient désignés et rendus responsables de groupes définis de germes. Un laboratoire pourrait s'occuper de la conservation de souches standard usuelles pour l'enseignement, un autre conserverait les souches présentant un intérêt médical, vétérinaire, agricole...

Une centrale administrative établirait la liaison entre ces diverses sections et les quémandeurs. Cette deuxième solution qui nécessite, cela va sans dire, une organisation parfaite, a l'avantage d'utiliser toutes les collections existantes sans exiger de dépenses supplémentaires extraordinaires.

Une collaboration scientifique internationale étendue et un large système d'échanges réciproques sont les conditions essentielles de la réussite d'une telle entreprise. Le quatrième Congrès international de l'Association des Microbiologistes qui devait avoir lieu en 1942 à Copenhague fut renvoyé et ne put discuter pratiquement des mesures à prendre dans ce but, mais l'idée était en bonne voie.

La fin de la guerre, les problèmes de reconstruction et de réorganisation de tous ordres, l'échange libre et rapide des informations et du matériel ne pouvaient que faciliter la tâche de ceux qui, conscients de cette nécessité et mettant à profit toutes ces données, s'étaient fixé comme but la création pratique de ce Centre de Collection.

CENTRE DE LAUSANNE

Mon maître, le Professeur Hauduroy qui, en 1938 déjà, écrivait les lignes suivantes sous le titre : « *Etablissement d'une collection internationale* » (62)

Ce dernier travail qui ne rentre pas dans l'édification d'une nomenclature me paraît cependant indispensable. Les botanistes ont

constitué des flores, les mycologues établissent des mycothèques. Une collection internationale, où seraient gardés les types de bactéries décrites, rendrait d'immenses services. A la disposition des chercheurs, elle fournirait les types de microbes dont ils peuvent avoir besoin. Inversement les travailleurs découvrant une bactérie qu'ils croient nouvelle pourraient la lui adresser pour détermination précise. Ainsi seraient évitées ces descriptions sous deux noms différents d'un même genre ou l'attribution à un germe nouveau du nom d'un autre germe. La précision de la Science bactériologique ne pourrait qu'y gagner. Les difficultés techniques de l'établissement d'une telle collection sont inexistantes. »

se devait d'être au courant des vœux émis et des résolutions prises dans ce sens. Conscient du service éminemment utile qu'il y aurait à rendre aux chercheurs, il adresse au début de l'année 1943, au Professeur Gigon, secrétaire général de l'« Académie suisse des Sciences médicales », un projet administratif et technique d'aménagement d'une collection de Types Microbiens, et rencontre auprès de cette société savante, l'accueil le plus compréhensif. Ce projet insiste tout d'abord sur les lacunes que présentent les collections existantes et la nécessité d'organiser ces dernières d'une manière conforme aux exigences de la technique et aux conceptions de la bactériologie moderne. Comment atteindre ce but, si ce n'est en travaillant en relation étroite avec les spécialistes du monde entier. Il signale en outre que la création d'une collection microbienne, en Suisse, pendant la guerre, constitue une contribution utile à l'œuvre si remarquable entreprise par l'« Académie suisse des Sciences médicales », contribution que ne doivent pas handicaper des considérations financières. Le projet aborde ensuite l'organisation générale du centre et prévoit un Comité de Direction pour en assurer la bonne marche. Ce Comité se compose d'un représentant de l'« Académie suisse des Sciences médicales », du directeur du « Service fédéral de l'hygiène publique », d'un représentant du « Comité d'Hygiène de la S. d. N. », du doyen d'une des Facultés de médecine de Suisse et du directeur de la collection, désigné en la personne du Professeur de Bactériologie et d'Hygiène de la Faculté de médecine de Lausanne. Ce directeur, chargé de la direction technique et administrative du Centre, engage ses collaborateurs et fait exécuter toutes les décisions prises par le Comité de Direction auquel il rend compte de son activité. La suite du projet, après quelques considérations financières concernant les sources de revenus et les dépenses du Centre, propose la création d'un conseil scientifique qui, par la collaboration de ses membres, nommés par le Comité de Direction et choisis parmi les spécialistes des différents aspects de la bactériologie, faciliterait la bonne marche du Centre. Nous verrons plus tard que cet organisme prendra une grande impor-

tance et entourera le Centre du prestige et de l'autorité que mérite cette institution internationale.

Grâce à la compréhension du Conseil d'Etat du canton de Vaud et particulièrement grâce à celle du chef du Département de l'instruction publique et des cultes, la Collection pourra s'installer dans plusieurs locaux disponibles à l'Institut d'Hygiène de Lausanne. Elle aura en outre la possibilité d'utiliser les installations déjà existantes telles que : cuisine, écurie, locaux de réserve... d'où économie de temps et de matériel.

Le projet se termine par la description d'un catalogue, composé de fiches et conçu d'une façon entièrement moderne, où chaque bactérie dénommée d'une façon exacte, ne serait plus sujette aux discussions qu'entraîne la synonymie par exemple.

L'« Académie suisse des Sciences médicales », après discussion du projet décide de patronner et de subventionner le Centre et accorde un crédit de 10,000 fr. pour l'année 1944. MM. les professeurs Wegelin et Rothlin, au nom du Sénat, insistent sur l'importance de l'établissement d'un catalogue des bactéries, du rôle du Comité scientifique, de la collection du Centre. Dans une lettre du début de février 1944, ils proposent les membres d'une Commission du Centre. MM. les professeurs Fauconnet du « Service fédéral de l'Hygiène publique », Hauduroy, Rey, de Genève, Tomcsik, de Bâle et M. le Dr Biraud de la S. d. N. participent à la première séance de cette commission qui se réunit à Berne le 27 mai 1944. La discussion soulevée à propos de la dénomination du Centre aboutit au choix du titre suivant : « Centre de Collection de Types Microbiens » sous le patronage de l'Académie suisse des Sciences médicales (Institut d'Hygiène et de Bactériologie de la Faculté de médecine de Lausanne). La mise au point des statuts n'entraîne pas de difficultés grâce à la collaboration du professeur Gigon, secrétaire de l'Académie suisse des Sciences médicales, et du professeur Hauduroy qui dans une lettre du 30 octobre 1944 signale que l'élaboration des statuts est terminée et que par conséquent la Commission du Centre, prévue par l'Académie, a terminé son rôle. Il s'agit maintenant de mettre en route le travail effectif du Centre et de désigner le plus rapidement possible les membres du Comité directeur.

Les statuts définitifs sont alors adoptés et comprennent dix articles : les buts du Centre sont définis dans

l'article 1 : le Centre aura à conserver les diverses variétés de microbes et d'ultravirus, à les fournir aux quémanteurs, à en tenir un catalogue constamment à jour — catalogue dont il assurera la diffusion — et à contribuer par tous les moyens à l'avancement de la science bactériologique.

L'article 2 : fixe le siège de l'organisation à l'Institut d'Hygiène de la Faculté de médecine de Lausanne.

L'article 3 : confirme le nom de l'Institution accepté par la commission du Centre.

L'article 4 : énumère les organes du Centre qui sont : le Comité directeur, le Directeur, et le Conseil scientifique.

L'article 5 : prévoit que le Comité directeur comprend six membres, dont deux représentants de l'Académie suisse des Sciences médicales et des représentants de l'Organisation fédérale d'Hygiène vétérinaire, de la Commission permanente de standardisation biologique de l'organisation d'Hygiène de la S. d. N. et des autorités du canton de Vaud. Les membres du Comité directeur, dont le directeur du Centre est le secrétaire, sont nommés pour trois ans et rééligibles.

L'article 6, consacré au directeur du Centre, précise que ce dernier est nommé par le Comité directeur, qu'il est chargé de la direction technique et administrative du Centre et qu'il peut être, au besoin, remplacé par son chef de laboratoire.

L'article 7 s'occupe de la composition du Conseil scientifique, dont les membres peuvent être choisis parmi les bactériologistes du monde entier et dont le rôle est d'aider le Comité directeur à atteindre le but que le Centre s'est proposé.

La comptabilité du Centre fait l'objet de l'article 8, qui, après avoir cité les possibilités de recettes et de dépenses, signale que les comptes seront tenus par le comptable de l'Institut d'Hygiène et de Bactériologie de la Faculté de médecine de Lausanne.

Les articles 9 et 10 concernent l'entrée en vigueur des statuts et leurs modifications éventuelles.

Dès ce moment, c'est-à-dire dès la fin de 1944, les bases de l'organisation sont établies et permettent de se mettre au travail tandis que le premier Comité directeur dont les membres sont MM. les professeurs Michaud, Mooser, Flückiger, Hauduroy, M. le Dr Biraud et M. P. Perret, chef du Département de l'instruction publique du canton de Vaud, ne tarde pas à prendre les mesures indispensables à la bonne marche de l'organisation.

Sous ces auspices favorables, la première réunion du Conseil scientifique du Centre de Collection de Types Microbiens, que seule la guerre et ses conséquences avaient retardée jusqu'à cette date, tint ses assises à Lausanne au début de mai 1946. (175) Après trois jours d'un travail utile et après un très large échange de vues, les résolutions et les mesures nécessaires à la réalisation pratique des buts du Centre furent adoptées permettant les plus grands espoirs quant à l'avenir de cette institution scientifique, destinée avant tout à rendre service, et dont on peut croire qu'elle contribuera à l'amélioration des relations internationales aussi bien scientifiques que politiques.

L'assemblée aborda ses travaux inspirée par le message de J. Bordet qui ne manquait pas de souligner les services que pourra rendre le Centre de Collection en fournissant aux tra-

vailleurs des souches microbiennes d'authenticité certaine, avec leur histoire et leurs caractères.

Grâce aux notes préliminaires rédigées par le professeur Hauduroy, les différents points sont abordés tour à tour dans un véritable esprit de clarté et de synthèse. On décide la création d'un certain nombre de commissions : les savants s'occupant des mêmes problèmes se réunissent et, grâce à cette spécialisation dans la discussion même, d'excellentes résolutions peuvent être prises.

La commission des aérobies décide de soumettre aux sociétés savantes de chaque pays les principes adoptés au cours de la conférence du Comité scientifique, d'adopter le système du catalogue à fiches et formule en outre l'espoir que ces suggestions seront acceptées par l'« Association internationale des Microbiologistes ». La commission des anaérobies, dont le seul membre présent à Lausanne est le Dr Prévot, se rallie aussi au système du catalogue à fiches, en insistant sur l'introduction dans la description de la souche du type fermentaire, élément important du diagnostic des anaérobies et sur la nécessité de rechercher les meilleures méthodes de conservation des anaérobies.

La commission de bactériologie agricole et industrielle décide de créer des groupes pour les bactéries du sol, des engrais, des eaux naturelles et résiduaires, des produits végétaux, des fourrages, du lait, de la bière, du vin et dérivés, des viandes, des conserves et des fermentations industrielles. Il adopte aussi le catalogue à fiches pour les bactéries de son domaine.

La commission de mycologie décide d'établir des relations entre les principales collections de cryptogames, mais relève qu'il sera difficile de faire une fiche pour chacun d'eux.

La commission de protozoologie prévoit la nécessité d'utiliser au moins deux modèles de fiches pour le catalogue, car il existe de grandes différences entre les organismes cultivés *in vitro* et ceux cultivés *in vivo*. Plusieurs types de fiches paraissent aussi nécessaires aux membres de la commission des virus, rickettsiae et bactériophages.

Les membres de ces diverses commissions ont la faculté de s'adjoindre tous les savants dont la présence leur paraîtrait nécessaire pour mener à bien leurs travaux.

Le conseil aborde ensuite la question du catalogue. Le principe des fiches est donc admis. Il existera au minimum deux modèles de fiches, le premier, la fiche standard, imprimée en rouge et rédigée en deux langues.

La description de chaque souche sera faite avec grande précision, avec indication en référence des techniques de recherches utilisées, de l'origine des produits d'analyse et des milieux de culture. Chaque fiche doit être une histoire de la souche avec citation de l'origine, des dates des divers examens, des repi-

quages, elle constitue en fait l'unité d'un traité monumental de microbiologie.

Il est en outre décidé d'utiliser la nomenclature de Bergey suivie de tous les synonymes existants avec, entre parenthèses, l'indication de la souche si nécessaire. Pour faciliter les demandes, le conseil décide que les fiches, dont l'entête sera toujours établie selon le même modèle, porteront dans l'angle supérieur droit une indication composée d'une lettre ou d'un groupe de lettres : A : aérobies, An : anaérobies, Vi : virus, rickettsiae, bactériophage, I : bactérie agricole et industrielle, Pr : protozoologie et spirochètes, My : mycologie, et d'un chiffre qui correspondra simplement à l'ordre d'inscription de la souche au catalogue.

Cette désignation particulière, évite en outre toutes les confusions possibles entre les différentes souches en simplifiant toutes les demandes et la transmission des renseignements.

Le vaste domaine des méthodes d'identification des micro-organismes ne peut être laissé dans l'ombre par le Conseil scientifique. Il importe, bien entendu, d'utiliser les meilleures techniques, mais les critères d'appréciation ne sont pas encore suffisants pour faire ce choix de façon judicieuse, aussi est-il suggéré d'utiliser provisoirement comme base les méthodes publiées par la Commission de Standardisation dans le « Manuel of pure Culture Study of Bacteries. H. J. Conn (Agricultural Experiment Station) Geneva, New-York. » Le problème de l'unification des méthodes de détermination, pour autant qu'elle soit possible, est laissée aux soins de la « Société internationale de Microbiologie ».

Une autre question est mise en discussion, celle de la conservation des bactéries. Quelles sont les meilleures méthodes ? Est-il nécessaire d'en rechercher d'autres ? Il est impossible de donner une réponse générale sans étudier les modalités de la conservation de chacun des groupes de bactéries, c'est ce que nous essayerons de faire à la fin de cet exposé.

Répondant ensuite au vœu si souvent émis de voir une coopération plus intense et plus féconde s'établir entre les divers savants, le Conseil décide d'entrer en contact avec la Société internationale de Microbiologie, de se faire représenter au prochain Congrès de Copenhague en 1947, d'amorcer des pourparlers avec l'U.N.E.S.C.O. et de créer les relations indispensables avec les collections du Nouveau Monde, des Etats-Unis en particulier.

Ainsi, grâce à l'initiative du professeur Hauduroy, et à la compréhension de tous, se trouve créé cet organisme si souvent envisagé et si nécessaire. La participation des principales collections existant actuellement assure doré et déjà le succès que mérite cette institution scientifique des plus utiles, institution dont la réalisation répond particulièrement bien aux vœux émis

récemment lors d'une assemblée de la « Society for General Microbiology » à Londres en décembre 1945. Les discussions de cette conférence furent consacrées en partie au sujet suivant : Role, Organisation and Maintenance of Collections of Living Microorganisms. Mlle prof. Werterdijk de Baarn, M. le prof. Kluyer de Delft et M. le Dr R. St. John-Brooks n'eurent pas de peine à montrer la nécessité de favoriser la coordination entre les différentes branches de la microbiologie de même que le développement des collections de microorganismes. Kluyer, insistant sur l'usage d'une collection, spécialement comme base de classification, lui assigna comme principale fonction, celle de donner la possibilité de faire de larges études comparatives et d'éviter la perte de souches par la distribution de doubles, tandis que St. John-Brooks suggéra la création d'une commission internationale pour favoriser la coopération et le développement des collections de germes microbiens : un bureau central international serait chargé d'assurer la réciprocité absolue entre les divers instituts dans l'échange soit des souches microbiennes soit des publications scientifiques.

Avant de terminer ce bref exposé sur l'évolution des collections bactériennes, qui conduisit du petit musée d'un chercheur ou d'un laboratoire à l'organisme international dont nous venons de suivre la création, il est peut-être intéressant d'esquisser un tableau du travail qui reste à faire et des avantages dont jouiront certainement les microbiologistes dans les années à venir. L'œuvre entreprise représente une tâche énorme qui ne pourra être menée à bien qu'avec le concours de tous, le travail acharné d'un personnel choisi et dévoué durant des années. Une série impressionnante de souches microbiennes qui sont simplement énumérées dans les divers catalogues devront être examinées afin d'en déterminer les caractères et d'établir la fiche correspondante. Pour ces recherches, l'emploi de méthodes précises, si possible standardisées pour un même groupe de germes s'avère nécessaire si l'on veut donner toute leur valeur aux études comparatives permettant l'identification et la classification des bactéries.

N'oublions pas non plus que ce travail ne sera pas fait une fois pour toutes pour un germe, car ce dernier, sujet aux variations et aux mutations que l'on sait, sera soumis à des examens périodiques rapprochés de six mois, d'un an ou plus suivant la méthode de conservation utilisée.

Douter des services que rendra cette institution et douter de sa réussite serait douter du courage, de la volonté et de l'autorité de ses initiateurs. Les obstacles matériels ne sont pas de nature à décourager ces derniers qui, travaillant avant tout pour rendre service et dans un but scientifique uniquement, seront sans cesse stimulés par l'intérêt qu'elle suscite et par

l'extension croissante qu'elle sera sans doute appelée à prendre. Ce Centre de Collection, n'est-il pas un précieux instrument de travail pour tous ceux qui s'occupent de microorganismes ? Aucun bactériologiste ne peut avoir la prétention de connaître à fond tous les domaines de sa branche, il lui est nécessaire de collaborer de façon constante et étroite avec les spécialistes. Vu sous cet angle nouveau, une collection dotée d'un catalogue semblable devient un véritable centre de documentation qui n'existait pas encore jusqu'à ce jour.

Les autres tâches du Centre

Les tâches du Centre pourront s'étendre encore à d'autres domaines. Cet organisme apparaît comme spécialement désigné pour contribuer à l'unification des méthodes d'études des germes et pour apporter de la précision dans les méthodes de détermination des bactéries. Il importe d'utiliser un langage et des méthodes précises valables pour tous et partout, tout en laissant cette liberté d'action qui incite l'expérimentateur à améliorer les méthodes existantes, à en chercher de nouvelles et en évitant ainsi de stéréotyper nos connaissances et d'en empêcher le progrès. L'utilité manifeste qu'il y aurait à rendre uniformes les diverses conditions de travail est bien mise en évidence par la majorité des chercheurs qui ne manquent pas d'affirmer cette tendance en faveur de l'établissement d'un système unique de classification et de techniques, surpris qu'ils sont de voir les divergences existant sous ce rapport de pays à pays, d'école à école, même pour les notions élémentaires et courantes, constituer une source de retard dans les échanges, de malentendus et de confusion. Ces derniers ne sont-ils pas un obstacle à l'avancement des connaissances dans les divers domaines de la microbiologie ? Il est facile de citer plus de dix-huit méthodes différentes de recherche de l'indol, toute une série pour la recherche de l'acétylméthylcarbinol, plusieurs encore pour les fermentations sucrées, méthodes qui toutes ont des sensibilités différentes. Si les exigences étaient partout identiques, nous aurions fait un grand pas... vers une plus grande précision, qui est peut-être ce qui manque le plus à la bactériologie d'aujourd'hui.

La bactériologie a été, à sa naissance, comme la plupart des disciplines biologiques, une science simple, ses lois étaient claires et d'emblée elle éveilla les plus grands espoirs. Mais bientôt l'accumulation des expériences et la multitude des faits observés devinrent tels que les bases même de cette science encore jeune furent ébranlées, voire mises en doute. Les bactériologistes virent surgir et disparaître de nombreuses théories les unes après les autres, la dernière étant toujours la plus séduisante, mais qu'une

observation nouvelle ne tardait souvent pas à faire sombrer pour toujours.

Aujourd'hui plus que hier, il est difficile sinon impossible de parcourir le flot énorme de littérature qui grandit chaque jour, de contrôler la valeur des méthodes de recherches proposées, l'exactitude des déductions expérimentales et de choisir quelle est la meilleure voie à suivre dans l'immense dispersion de travaux. Si l'on s'arrête un instant devant cette moisson prodigieuse de faits et d'expériences, on éprouve le besoin de mettre un peu d'ordre : la bactériologie en est à ce stade et là aussi le Centre de Collection pourrait rendre de grands services.

Aider l'établissement de la nomenclature

L'exemple de la classification bactérienne est typique. Chercher ou établir la meilleure classification ou celle qui, moyennant quelques modifications, serait valable pour tous les bactériologistes est une tâche des plus importantes et ne dépend que des congrès internationaux. On éviterait ainsi par cette unification de langage, de nombreux malentendus, des travaux inutiles et bien des discussions stériles. Le Centre de Collection grâce au réseau international qu'il va établir et à la diffusion de son catalogue peut largement contribuer à ce travail utile de standardisation et d'unification.

Les classifications proposées pour les êtres vivants microscopiques sont innombrables et basées sur les critères les plus divers, un parcours rapide dans leur histoire est significatif à cet égard. Pour remonter bien loin en arrière dans le temps nous trouvons en :

- 1773 le *Vermium fluviatilum* et *terrestrium* de Müller qui introduisit en 1786 les termes d'*animalcula infusoria fluviatilia* et *marina*.
- 1826 le « Tableau des ordres, des familles et des genres de microscopiques basé sur la morphologie » de Bory St. Vincent.
- 1838 la classification d'Ehrenberg, qui constitue un grand progrès. Il utilise les termes : *Vibrio*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Bacterium*.
- 1841 la classification de Dujardin.
- 1852 la division des *infusoria* en *ciliata* et *phytozoïdia* par Perty.
- 1857 les « *Schizomycetes* » de Naegeli.
- 1865 la classification de Rabenhorst.
- 1868 la classification de Davaine (*Bacteridium*).
- 1872 la classification de Cohn (*Bacillus*).
- 1875 une extension de la première classification de Cohn qui introduit des termes nouveaux tels que *Streptococcus* par exemple. Cette classification constitue le point de départ d'une classification réelle des bactéries.
- 1877 la division de *Shizophyta* en quatre ordres par Mc Nab's.
- 1879 la classification importante de Trevisan.
- 1879 la discussion des genres bactériens dans le premier volume de botanique de Luerssen.

- 1880 la classification très complète de Winter que modifie Innessan.
- 1883 la classification de Zopf.
- 1884 la classification de De Bary.
- 1884 la classification de Grove, reprise de Winter.
- 1884 l'identification des bactéries aux algues bleues par Van Tieghem.
- 1884 la définition du Staphylocoque et du Streptocoque par Rosenbach.
- 1885 une extension de la classification de Zopf.
- 1886 la classification de Flügge.
- 1886 la classification de Schröter, très complète pour l'époque.
- 1887 une nouvelle classification de Trevisan.
- 1887 la classification de Maggi.
- 1888 les genres nouveaux de Winogradsky pour les B. sulfureuses.
- 1888 la classification de Hansgirg.
- 1889 la classification de Trevisan et de De Toni qui comprend déjà plus de 650 espèces.
- 1890 la classification de Baumgarten qui reste sans succès.
- 1890 la classification imprécise de Cornil-Babes.
- 1890 la première classification de Migula.
- 1892 la classification de Ludwig qui constitue une avance réelle.
- 1892 la classification incomplète de Sternberg.
- 1892 la seconde classification de Migula (Schizomycetes).
- 1895 la première classification de Fischer.
- 1896 le schéma de Lehmann et Neumann qui est probablement une des meilleures classifications proposées.
Ces trois derniers systèmes constituent la base de tout le travail systématique accompli durant les vingt années qui suivent.
- 1897 une modification de la classification de Fischer.
- 1897 des modifications de la classification de Migula par Chester.
- 1899 une revision de la classification de Chester.
- 1900 la division des Shizomycetes en Eubacteria et Thiobacteria par Migula.
- 1901 un nouveau système de Chester.
- 1902 une modification de la classification de Migula par Kendall.
- 1902 le schéma simple de Matzschita.
- 1903 une classification de Fischer.
- 1905 une étude de la classification de Migula par Smith.
- 1907 une classification des b. sulfureuses par Molisch.
- 1907 Swellengrebel classe les spirilles.
- 1907 Ellis groupe les ferrobactéries.
- 1908 les études sur les cocaacées par Winslow.
- 1908 la classification utile des bactéries pathogènes par Flügge.
- 1908 la classification des Trichomycetes par Jordan.
- 1909 la classification de Conn.
- 1909 la classification de Orla-Jensen, peu claire souvent.
- 1910 la classification des « Eisenbakterien » par Molisch.
- 1911 la classification de Heim.
- 1912 la classification très complète de Benecke.
- 1912 les classifications d'Engler et de Meyer.
- 1913 la classification de Löhnis.
- 1913 Vuillemin propose une classification en vue du Congrès de Botanique.

- 1914 la classification des Spirochetes de Gonder.
- 1915 les modifications à la terminologie de Winslow par Buchanan.
- 1917 la classification de Enderlein.
- 1917-1918 les articles sur « Etudes de la nomenclature et de la classification des Bactéries » par Buchanan.
- 1917 le Rapport préliminaire de la Société des Bactériologistes américains pour la classification des Types bactériens.
Ce travail constitue une véritable synthèse des systématiques bactériennes et va être appelé à prendre une extension importante.
- 1919 la classification détaillée de Castellani et Chalmers.
- 1920 la classification de Winslow et al. selon les rapports de la Société des bactériologistes américains.
- 1921 Orla-Jensen modifie quelque peu sa première classification.
- 1922 la classification des clostridiaceae par Heller.
- 1923 Manual of Determinative Bacteriology publié par le Committee of the Society of American Bacteriologists où l'on modifie légèrement la classification de Winslow. Cette classification publiée dans le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology va subir de légères modifications avec les éditions au nombre de six qui s'échelonnent de 1923 à 1946. Elle constitue, malgré ses lacunes, le système le plus complet proposé jusqu'à maintenant.
- 1923 la classification de Pringsheim qui reprend le système de Lehmann et de Neumann.
- 1924 la classification de Janke, extension de celle de Migula.
- 1925 modification de la classification de Enderlein publiée en 1917.
- 1927 Lehmann et Neumann développent leur classification de 1896.
- 1929 Janke reprend cette dernière classification et la modifie encore.
- 1929 Bribram modifie la classification du Bergey's Manuel.
- 1933 Bribram développe encore son système, après les expériences qu'il fait à la collection Kral à Vienne.
- 1933 Prévot propose une nouvelle classification des bactéries et discute les lois et les principes de classification.
- 1936 Kluyer et van Niel mettent au point une nouvelle classification.
- 1937 Rahn propose quelques revisions dans la classification des Eubactériales.
- 1940 la classification des anaérobies de Prévot.

Cette longue liste de systèmes partiels ou complets, proposés par tant d'auteurs différents ne comprend pas la multitude de noms qui furent introduits isolément par les chercheurs de divers pays. Cet effort scientifique considérable a donné souvent des résultats modestes et quelquefois inutilisables. Il est donc temps d'évoluer, grâce à des échanges plus intenses, vers plus de clarté et de logique, et aussi d'utilité et d'économie. Aucune de ces classifications n'est basée sur les mêmes principes de nomenclature, il en résulte le fait certain que l'introduction d'un grand nombre de synonymes des termes anciens, souvent satisfaisants, a créé une confusion dont pâtit toute la bactériologie d'aujourd'hui. Il importe de suivre les règles de la nomenclature inter-

nationale, de maintenir les termes anciens pour autant qu'ils sont définis et descriptifs et qu'ils sont susceptibles de s'adapter au développement de la bactériologie.

Créer une classification idéale a été le vœu de beaucoup, mais les auteurs qui tentèrent cette réalisation virent souvent leur système sombrer dans l'oubli parce que la réalité des faits et l'apport constant de données nouvelles les rendaient inacceptables. Les classifications dont l'importance est indéniable sont surtout celles proposées par des auteurs réalistes tels que Lehmann et Neumann, Migula, Chester et Bergey et Al. par exemple. Ces systèmes quoique imparfaits rendirent et rendent encore d'éminents services aux chercheurs. Le mérite de Bergey surtout est d'avoir entrepris une revue de l'énorme littérature concernant la systématique bactérienne et d'en avoir donné une vue générale et réaliste.

Ce travail systématique de la littérature fit ressortir des imperfections nombreuses et nécessita de nouvelles recherches qui sont encore en cours en ce moment. Il importerait donc aujourd'hui de confier à des spécialistes la tâche de reviser toute une série de groupes de bactéries dans l'esprit de ceux qui entreprirent cette besogne ardue, en particulier Bergey et ses collaborateurs, et de réaliser sous la direction d'un comité international la mise au point d'une classification susceptible de s'améliorer constamment, car aucune des classifications proposées n'est parfaite et ne peut être considérée comme définitive. Il semble pourtant que la plus complète, quoique sujette encore à de nombreuses critiques, soit celle de Bergey et Al. qui mentionne près de 6000 espèces bactériennes, aussi bien pathogènes que saprophytes. Elle constitue un véritable schéma constructif, une tentative heureuse de sortir la bactériologie du chaos où elle se trouve, tout en conservant les nombreuses données valables acquises précédemment. Susceptible d'améliorations, elle constitue une base sur laquelle il sera possible d'établir une classification internationale semblable à celles qu'ont établies les botanistes et les zoologistes. Elle a en outre le mérite de suivre dans sa nomenclature les règles du code botanique, établi aux « Congrès international de Botanique » de Vienne en 1905, de Bruxelles en 1910, et de Cambridge en 1930, code qui propose des règles simples basées sur des notions claires, la fixité des noms choisis, la suppression des termes inutiles ou prêtant à confusion et qui préconise la division en grands groupes : classe, ordre, famille, genre puis espèce et variété.

La nomenclature peut être arbitraire et se baser sur des conventions, mais il n'en est pas de même de la systématique, véritable science, dont le rôle est de découvrir les lois qui déterminent les groupements naturels des êtres vivants, en particulier des germes microbiens. Ces lois sont actuellement peu ou mal

connues : leur étude et leur application constituent une tâche d'avenir et ne dépendent que de la volonté des chercheurs et de l'amélioration des techniques.

Pour l'établissement d'une classification microbienne il importe d'utiliser tous les caractères des bactéries, caractères dont l'appréciation repose sur une base statistique, d'en établir la hiérarchie en passant de la morphologie à la physiologie par les réactions cytochimiques, culturales, de résistance aux agents chimiques et physiques, le métabolisme, les fermentations, la biochimie, la structure antigénique, le rôle pathogène... Chacun des groupes créés doit être homogène et réunir des individus qui ont une valeur commune.

La standardisation des techniques, l'unification des méthodes, la systématique bactérienne constituent des sujets d'études des plus valables et du plus haut intérêt. Un Centre de Collection, après les avoir délimités, avec soin et après avoir marqué ce qu'avant tout il importe d'établir, de préciser, de fixer, pourrait organiser les recherches en équipe, en se réservant le rôle difficile de dresser des questionnaires, de rapprocher les réponses fournies, d'en dégager les éléments de solution, d'ordonner des suppléments d'enquête, de mettre en évidence les rapports du problème avec l'ensemble des problèmes qui préoccupent les bactériologues... son rôle serait ainsi plus grand que celui de simple fabricant de catalogue.

CHAPITRE DEUXIÈME

PROCÉDÉS DE CONSERVATION DES BACTÉRIES

Le laboratoire qui possède une collection de germes et qui veut la mettre à la disposition des chercheurs se trouve placé devant le problème aux aspects multiples qu'est celui de son entretien. La constance des souches microbiennes, aussi bien dans leurs caractères morphologiques que biologiques, constitue un élément essentiel de l'organisation technique d'une collection, puisque ces germes dont les caractères vont être précisés sont destinés à des recherches qui exigent d'eux le maximum de stabilité. Le repiquage régulier sur les milieux usuels demande un très gros travail, exige beaucoup de personnel, beaucoup de temps et entraîne des manipulations nombreuses où l'on peut voir des cultures se polluer, perdre leur vitalité ou leur virulence, présenter des modifications biologiques telles que la perte du pouvoir antigénique ou du pouvoir hémolysant. On a parlé de mutations, de variations plus ou moins durables, de formes de défense sans toujours préciser le sens donné à ces mots, pour autant qu'un mot puisse représenter une idée !

Ces inconvénients n'ont pas échappé aux expérimentateurs qui réalisèrent le sérieux de l'obstacle mis à la conservation sûre de souches microbiennes stables. Cet état de choses donna naissance à une multitude de recherches, permit la découverte et l'application de principes nouveaux et nous autorise aujourd'hui à affirmer qu'il est possible de conserver des bactéries pendant de longues durées dépassant plusieurs années avec le maximum de stabilité, c'est-à-dire sans modification de leurs caractères. Poursuivant des buts très divers et conscients de la nécessité de la conservation des bactéries, de nombreux travailleurs cherchèrent dès le début de la bactériologie, à préciser l'action des éléments chimiques, physiques et biologiques connus sur les bactéries. Ces travaux aboutirent à des résultats très intéressants et permirent, indirectement souvent, d'améliorer les méthodes de conservation des microbes. Tout de suite on se rendit compte de l'action néfaste de la lumière, puis on établit peu à peu les limites de température compatibles avec la survivance des différents germes. Nous n'insisterons pas sur toute une série de recherches portant sur l'action du courant électrique, des rayons ultraviolets, des rayons de Röntgen, des émanations du radium, des sons et des ultrasons, des sels et de l'action olygodynamique de certains métaux. Ce qui peut intéresser directement le travail que nous poursuivons sont les actions du froid et de la dessiccation. Le froid fut largement étudié quant à son rôle sur la vitalité, la virulence et les caractères importants des germes visibles et des virus. La plupart des auteurs qui se sont occupés de cette question ont attiré l'attention des savants sur une constatation des plus importantes. Pasteur (111) déjà en 1861 constate que certains germes résistent à une température de -30° . Von Frisch (49) en 1877 n'arrive pas à tuer des germes sporulés en les soumettant à une température de -110° C. Pictet et Yung (112) en 1884 appliquent -200° C sans observer d'action nocive. Les travaux se multiplient et en les consultant on peut dire que la majorité des auteurs estiment que l'action du froid est nulle sur la plupart des germes pour autant que l'on travaille avec des températures éloignées de 0° C ; tout au plus observe-t-on parfois un retard dans l'apparition de certains caractères après un séjour des germes à basse température.

Becquerel (8), en 1931, pense que le froid associé à la dessiccation et au vide constitue le conditionnement permettant d'amener des cultures à l'état de « vie suspendue ».

Les basses températures appliquées brutalement ont donc une action peu nocive, ne modifient que peu ou pas les caractères des germes et l'on observe même une adaptation, une augmentation de la résistance au froid, surtout si les bactéries sont protégées par des protéines ou des sucres.

L'action de dessiccation, obtenue par les moyens les plus

divers varie avec une multitude de facteurs : l'espèce et le nombre initial de germes, la nature du milieu de suspension ou de culture, la rapidité et la température de dessiccation et la constitution gazeuse de l'ambiance.

Quels sont maintenant les divers procédés utilisés pour la conservation des bactéries ? Avant de les passer en revue il est intéressant de considérer les principes généraux qui se précéderont au cours des recherches et dont on appréciera de plus en plus l'importance dans la conservation des bactéries. L'expérience montre qu'une culture croît, se reproduit et meurt d'autant plus rapidement que les conditions de son développement sont favorables, pour une quantité donnée du milieu de culture bien entendu, tandis que plus une bactérie est proche de ses conditions de vie latente ou d'anabiose selon Guyénot, plus sa mort est retardée. Il importe donc de savoir quel est le maximum de latence compatible avec le maintien de la vitalité et assurant la plus grande stabilité. On peut dire de façon générale que pour permettre le développement des bactéries il faut :

- 1) de l'humidité
- 2) de la chaleur
- 3) de l'oxygène (aérobie ou non)
- 4) des aliments dont l'utilisation est dépendante de l'humidité.

La plupart des méthodes de conservation ont à leur base la suppression de tout ou partie de ces divers éléments. Les méthodes actuelles de conservation par la dessiccation sont probablement celles qui réduisent chacun de ces éléments à son minimum, mais avant d'entrer dans les détails de leur histoire et de leur technique, je tiens à citer d'autres méthodes dont quelques-unes excellentes sont encore utilisées aujourd'hui

Soyka et Kral (150) sont les premiers à aborder systématiquement le problème de la conservation des bactéries et publient en 1887 après plusieurs années de travaux, le résultat de leurs recherches. Ils pratiquent leurs cultures dans des tubes contenant des milieux solides tels que pomme de terre, riz, pain, carotte, puis les ferment à la paraffine, ce qui n'empêche pas un dessèchement trop rapide des bactéries, fait que Soyka considère comme l'obstacle principal au maintien de leur vitalité. Il pense qu'il faut éliminer l'air des tubes de cultures à conserver. Ils obtiennent pourtant une prolongation de la durée de la vitalité de certains germes.

Eisenberg (33) en 1888, propose d'utiliser non plus un milieu solide, mais une purée de pomme de terre, mais Kiefer constate que les Streptocoques ne se conservent pas par ce procédé. La même année, Duclaux, écrivant de la conservation des cultures, s'en réfère aux résultats qu'il avait publiés en 1885

(30) dans les Annales de Chimie et de Physique. Sa méthode consiste à aspirer dans de petites ampoules à double effilure le milieu liquide où se trouvent les germes et de sceller ensuite l'ampoule aux deux effilures qu'il suffira de casser à l'emploi. Duclaux admet que ce procédé n'est valable que pour un nombre limité de bactéries, il fut pourtant largement utilisé et l'est encore couramment dans plusieurs laboratoires où l'introduction des ampoules à la glacière n'a fait qu'améliorer les résultats.

Mais aucune de ces méthodes n'entraîne de généralisation utile et des années passent avant l'apport de données nouvelles. J'évite à dessein les procédés de conservation par la dessiccation que je reprendrai plus tard, pour citer le travail important d'Ungermann en 1918 (162) qui décrit un procédé simple pour obtenir des cultures durables de microbes fragiles et conserver la virulence des germes pathogènes pour les animaux. Pour cet auteur, l'élément important est d'éviter le contact avec l'oxygène: il cultive les bactéries dans des milieux très riches et met simplement à la surface de la culture une couche de paraffine liquide.

Quelques années plus tard, Michael (94) simplifie la méthode d'Ungermann en cultivant ses bactéries sur des milieux ordinaires au lieu d'utiliser du serum humain ou de lapin. Il recouvre de paraffine liquide les cultures sur gélose ascite et obtient des résultats intéressants pour le méningocoque et le streptocoque qu'il conserve plus d'un mois, le diphtérique six mois, le gonocoque cinq mois, tandis que les résultats sont incertains pour le pneumocoque et le bacille de l'influenza.

En 1923, Puntoni (118-119) publie une méthode permettant de conserver à longue échéance certaines espèces de bactéries sans altération de leurs propriétés culturales, biochimiques et de leur virulence. Il recommande la conservation en ampoules contenant du sang et scellées au chalumeau. Désirant maintenir la virulence des bactéries à la même intensité qu'au moment de fermeture des ampoules, il conseille d'inoculer les germes par injection intraveineuse au lapin ou à un autre animal sensible; il fait ensuite une saignée au moment où la température de l'animal monte et où ce dernier donne des signes de maladie, le sang est alors défibriné, puis maintenu à l'étuve pendant 24 heures pour contrôle et finalement distribué en ampoules de 1,2 ou 5 cc que l'on scelle. Il est possible de conserver de cette manière aussi du sang infecté prélevé directement dans le cœur d'un animal qui vient de mourir, de même que du liquide péritoneal. Les bactéries non virulentes sontensemencées dans du sang de lapin défibriné et conservé de la même façon. La vitalité de germes tels que ceux du groupe typho-paratypho-coli, du groupe dysentérique, les staphylocoques, le vibrion cholérique, les streptocoques, le b. diphtérique, et le b. pesteux s'est conservée pendant dix à vingt ans, résultats confirmés par Puntoni lui-

même lors de sa visite à Lausanne en sa qualité de membre du Conseil scientifique du Centre de Collection de Types Microbiens.

En 1924, Truche reprend le procédé d'Ungermann qu'il trouve excellent en le modifiant toutefois par l'emploi de serum formolé de Legroux (ascite artificielle) stérilisé à l'autoclave. Il répartit huit cc de ce serum dans des éprouvettes ordinaires et les recouvre de deux à trois cc de paraffine liquide stérile. Sa méthode consiste à ensemencher le microbe sur gélose, d'étaler après 24 h. de culture le serum formolé à la surface de la couche de bactéries, qui se détachent ensuite par simple agitation. Le serum contenant les germes est alors replacé dans le tube d'où on l'avait puisé. La conservation de la vitalité des germes par ce procédé ne dépasse pas un an.

Nissle en 1925, conserve du colibacille dans un mélange à parties égales, de paraffine liquide et de graisse de laine.

Dakomeit (26) en 1927 reprend ce procédé. Le mélange lanoline-paraffine dont le point de fusion est à 40 C, est stérilisé pendant 45 minutes à la vapeur. La culture développée sur milieu solide est alors placée au fond du tube avec une anse de platine, puis le mélange est fondu, pipeté et ajouté à la culture. Le tout est mis à la glacière. La conservation s'étend sur des mois et des années, mais cette méthode présente des difficultés et des manipulations peu pratiques et n'est pour ainsi dire pas utilisée.

En 1927 encore, Kurokawa et Ayahiro (75) donnent une variante de la méthode d'Ungermann dont ils gardent le principe mais dont ils modifient les milieux. Une purée de cerveau préparée selon la méthode de Ficker pour la culture du Bacille tuberculeux et du bouillon stérile sont mis en éprouvettes égales pour faire un total de 6 cc. Le tout est stérilisé à la vapeur et recouvert d'une bonne couche de liquide d'ascite et finalement d'une couche de 2 cm. de paraffine liquide. L'auteur fait remarquer que la qualité du milieu est proportionnelle à sa teneur en albumine.

Sette (146) en 1927 utilise du sang de lapin défibriné qu'il recouvre aussi d'une couche de paraffine liquide et conserve longtemps *Leptospira* ictéroïdes en ascite diluée.

Von Daranyi (27) critique les méthodes de Michael et de Dakomeit mais ne donne que les résultats généraux de ses recherches.

Trosky (153) reste un défenseur de la méthode d'Ungermann dont il remplace la gélose par de la gélatine ascite.

En 1932, Parish (124) obtient une survie moyenne de 16 à 22 semaines pour plusieurs germes réputés fragiles tels que le gonocoque, le méningocoque, le B. de l'influenza, le micrococcus catarrhalis... grâce à la méthode d'Ungermann.

Ce procédé et ses modifications sont encore à l'honneur maintenant pour la conservation de courte durée des germes,

surtout pour celle des anaérobies. Qu'il me soit permis de dire à titre documentaire que cette méthode se trouve apparemment réalisée dans la nature au niveau des gisements de pétrole. (96. 97.) (73. 51. 5. 6.) Les géologues admettent actuellement que la formation du pétrole est due à l'action diastasique de germes anaérobies qui ont transformé les matières organiques en hydrocarbures. Or, aujourd'hui on retrouve des bactéries, dont le rôle semble terminé, encore vivantes dans les eaux mères situées directement en dessous des nappes de pétrole dont certaines datent de millions d'années. Reste à savoir si ces bactéries se trouvent à l'état de vie latente ou si elles se reproduisent régulièrement dans de telles conditions ? Ont-elles gardé en outre leur faculté de transformer les matières organiques en hydrocarbures ? Une réponse à ces questions serait d'un grand intérêt à bien des égards.

Les procédés cités jusqu'ici s'appuient surtout sur le principe d'empêcher le dessèchement du substratum sur lequel on garde les microorganismes. Un autre principe opposé au précédent se trouve être à la base de méthodes de conservation qui ont pris une extension et une importance considérables aujourd'hui : la dessiccation.

En 1885 Arloing, Cornevin et Thomas (3) signalent que du liquide de pulpe de charbon symptomatique, répandu en couche mince et desséché à 35° C, reste virulent deux ans au moins. Ils remarquent en outre que le germe desséché est beaucoup plus résistant aux hautes températures que le germe frais.

Ehrlich reconnaît la stabilité du serum sec au siècle dernier déjà et l'on trouve en 1896, la description d'un appareil pour la dessiccation du serum. Ce dernier contenu dans un récipient est chauffé à 40° C, le récipient est relié à un condensateur à froid et finalement à une trompe à eau. Toutefois il faut attendre quelques années encore pour voir la dessiccation intervenir largement dans la conservation des bactéries.

En 1903, Vansteenberghe (159) dessèche avec succès du virus rabique.

En 1908, Ficker (48) publie ses essais sur la résistance du vibron cholérique après émulsion dans de l'eau, de l'urine, du serum, de la salive, du lait écrémé, émulsion qu'il dessèche ensuite à l'étuve à 37° C. Ses résultats furent peu favorables, ce que l'on comprend aisément aujourd'hui à la lumière des notions acquises depuis lors : la dessiccation à chaud, lente, détruit un grand nombre de germes, permet la concentration nuisible du milieu et explique pratiquement l'échec de cette méthode.

La même année voit paraître un travail d'une importance considérable dû à Shackell (149) aux Etats-Unis. Cet auteur apporte les éléments d'une technique entièrement nouvelle et quoique ses travaux n'aient pas porté sur la conservation des

bactéries, il n'en est pas moins le premier qui ait utilisé la sublimation pour la dessiccation. La sublimation est l'opération qui consiste à faire passer un élément de l'état solide à l'état gazeux, ou inversement, sans passer par l'état liquide. L'évaporation à basse température sous le vide, produisant une congélation du produit qui s'évapore et nous mettant en présence d'une sublimation de la glace, est déjà citée par William Hyde Wollaston (161) en 1813 à titre de curiosité. Leslie (80) en 1811 utilisait l'acide sulfurique pour absorber les vapeurs d'eau provenant de la sublimation de la glace. Ces deux auteurs ne firent pourtant pas de dessiccation.

Les travaux de Shackell portent sur des liquides organiques utilisés en bactériologie, tels que serum de cobaye gardant son complément, virus de la rage et sur d'autres substances encore. Il essaye tout d'abord de diminuer la durée de la dessiccation. Puis il introduit la congélation préalable du produit à dessécher, après s'être rendu compte que les températures de l'ordre de 100° C, souvent utilisées à cette époque pour l'élimination de l'eau, modifient la composition des substances soumises à leur action. Il mit à profit les données de Benedict et de Manning qui, quelques années auparavant, avait pu obtenir un vide poussé en vaporisant de l'éther éthylique dans un exsiccateur à tube et en évacuant cet éther avec une trompe à eau. L'éther sous cette forme déplace l'air et les vapeurs d'eau qui se dissolvent dans de l'acide sulfurique placé au fond de l'exsiccateur, procédé qui permet d'obtenir un vide de moins de 5 mm. Shackell améliore sensiblement le rendement de ce procédé en agitant l'acide sulfurique quelques secondes tous les quarts d'heure, évitant ainsi une saturation en eau de la surface uniquement. Sa méthode consiste donc à congeler préalablement le liquide à dessécher, de le soumettre ensuite à l'action d'une pompe donnant rapidement un vide de quelques fractions de mm Hg, et d'aider l'absorption des vapeurs d'eau par l'introduction d'acide sulfurique, fréquemment agité, dans le fond de l'exsiccateur. Il se rendit déjà compte de la nécessité d'une dessiccation rapide pour éviter toute modification chimique et pour obtenir des produits facilement solubles.

Des travaux innombrables, des modifications plus ou moins heureuses, confirmèrent les premières vues de Shackell et permirent une large application de sa méthode à la conservation des bactéries sous forme sèche.

Dans un autre domaine et reprenant une méthode déjà connue, Wulff (166) propose, pour stabiliser et conserver le charbon symptomatique en vue de la vaccination, de dessécher la musculature le contenant et de la pulvériser ensuite. La dessiccation à l'étuve suffit en général, mais il est préférable d'utiliser un courant d'air chaud, à 30° C environ. Récemment Roux et

Bouvier de l'Institut Galli Valerio ont obtenu des cultures positives à partir de souches desséchées depuis plus de trente ans. Du sang contenant b. Anthracis, desséché, de la même manière, permet la conservation de ce germe pendant des décades.

Hammer (65) en 1911, après de nombreux essais de conservation, constate qu'une dessiccation rapide sous le vide, est infiniment moins nocive que la dessiccation lente à l'air ou à l'étuve. Ces résultats furent confirmés par toute une série d'auteurs qui, les années suivantes, appliquèrent la dessiccation à des bactéries sporulées ou non, à des tumeurs filtrables, à la vaccine.

Rogers (169) en 1914, publie les résultats qu'il obtient en desséchant par sublimation des germes utilisés dans l'industrie laitière, et constate que cette dessiccation à basse température est très supérieure à la dessiccation à l'air chaud deshydraté, dont les résultats douteux ne pouvaient satisfaire les besoins industriels.

Puis ce sont entre autres Busson, Shattock, Dudgeon, Winslow, Abramson, Rous, Murphy, Hitchens, Parker, Löwi et Marmier (48, 81, 66, 95) en 1918 qui apportent aussi des résultats favorables.

Swift (147) en 1921 réussit à conserver très longtemps des bactéries avec tous leurs caractères par un procédé semblable à celui de Shackell, quelque peu amélioré. Il concentre la culture en une petite masse de bouillon, par centrifugation si nécessaire, et la répartit dans de petits tubes. Le tout est congelé, puis mis en présence d'anhydride phosphorique et placé dans un exsiccateur lui-même placé dans un mélange réfrigérant. Lorsqu'un vide de 2 à 3 mm est obtenu, tout l'appareil est mis à la glacière où il est laissé jusqu'à dessiccation complète pendant environ 12 h. Les tubes sont alors bouchés au coton et paraffinés ou scellés, puis conservés à la température du laboratoire à l'obscurité.

Il suffit pour l'emploi d'ajouter un peu d'eau ou de bouillon et de porter sur milieu de culture. L'auteur conserve de cette manière des streptocoques pendant trois à quatre ans. Ces résultats édifiants ne pouvaient qu'encourager les recherches. C'est pourquoi Heim (67) en 1922, puis Kirschner (74) expérimentent et conseillent la dessiccation pour la conservation de germes fragiles tels que les pneumocoques, les méningocoques et les gonocoques qui auraient gardé leur virulence après 5 à 6 mois.

En 1929, Sawyer (151) conserve avec succès du serum de jaunes par la dessiccation tandis qu'en 1931 Craigie (21) met au point la production de complément desséché par sublimation, prêt pour l'usage courant. Des contributions importantes sont apportées la même année et en 1932 par Reichel, Masuci et Boyer pour la conservation du serum et de divers produits biologiques par dessiccation.

Otten (145) directeur de l'Institut Pasteur de Bandoeng aux Indes néerlandaises, cite, dans une publication datant de 1929, Koch, Kitasato, Berckholtz, Flügge, Abel, Germano et Ficker qui dès 1884 pensaient déjà que les bactéries pathogènes ne pouvaient supporter une dessiccation complète, mais qu'elles devaient leur survie à un substratum les protégeant d'une deshydratation absolue. Son étude poussée et son exposé remarquable confirment ces observations, c'est-à-dire le rôle protecteur des protéines par exemple, l'action nocive de la dessiccation lente à l'air et des températures trop élevées. Il montre que des bactéries même très sensibles survivent très bien à la température ordinaire après dessiccation et résistent même sous cette forme à des températures élevées de l'ordre de 100° C par exemple. 37° C sont supportés pendant des mois sans aucun dommage, 42° C durant des semaines restent sans effet de même que 58-60° C pendant 7 à 8 jours. Otten montre en outre l'importance du milieu de culture et, utilisant le procédé d'une suspension très riche en germes qu'il dessèche et conserve dans le vide, il réussit à conserver pendant des mois des cultures d'Eberthella, de Shigella, de Pasteurella, de Salmonella, de Brucella et même de germes fragiles tels que le Méningocoque, le Gonocoque et le Pneumocoque. De ces expériences il tire un certain nombre d'observations qui constituent une base sûre pour les nombreux expérimentateurs qui, dès ce moment utilisent sa méthode et contribuent à l'améliorer. Il énonce quelques constantes expérimentales du plus haut intérêt : les bactéries mises en suspension épaisse et desséchées par sublimation, conservent leur vitalité durant des mois et des années. Plus cette suspension est riche en germes, plus la proportion des germes survivants est grande. Les protéines que contient le milieu de suspension exercent une action protectrice qu'Otten attribue aux propriétés du colloïde protecteur qu'elles représentent, mais cette explication ne semble pas correspondre au rôle d'un tel colloïde qui agit en imposant sa charge électrique aux micelles du colloïde instable, et les empêche de venir en contact pour former un coagulum. Ici nous avons à faire à une suspension de bactéries dans un colloïde et non pas à deux colloïdes en présence.

Otten ne manque pas d'insister dans ses conclusions sur les avantages et l'utilité de ce procédé de conservation des bactéries, bactéries qu'il est du reste le premier à maintenir sous le vide, tandis que Shackell, Hammer, Marmier, Swift et Heim se contentaient de les dessécher.

En septembre 1932, Pauli (123) de l'Institut de Sérothérapie de Milan, reprend la méthode d'Otten et de Swift avec des résultats très satisfaisants. Il dessèche des suspensions de bactéries en serum, obtenues à partir de cultures abondantes sur milieu solide. Il répartit 0,5 cc de suspension dans de petites

éprouvettes qu'il porte sous le vide dans un exsiccateur contenant de l'anhydride phosphorique. Lorsque la substance est desséchée, les ampoules sont scellées sous le vide au chalumeau. Le serum joue ici son rôle protecteur grâce à sa forte teneur en albumine, il présente toutefois un certain pouvoir lytique pour le *B. influenzae*, le *B. tussis convulsivae*, le *M. intracellularis*, le gonocoque, il est alors indiqué d'utiliser dans ces cas du liquide d'ascite, du blanc d'œuf ou de la gélatine. L'ensemencement des germes conservés de cette façon donne lieu à une culture semblable à celle que donne un repiquage ordinaire, mais exige quelquefois un délai de croissance plus long. Quant à la virulence, Pauli constate qu'elle n'est jamais diminuée et a même l'impression qu'elle est augmentée, pour la morve, le charbon et le pneumocoque par exemple. Toutes les autres propriétés biologiques restent inaltérées. Pour les anaérobies, Pauli conseille d'utiliser des cultures en serum de cheval que l'on répartit en ampoules et dessèche de la même manière que précédemment avec des résultats identiques. Il applique aussi cette méthode de conservation aux virus et même aux protozoaires qu'il réussit à conserver vivants plus d'un et demie.

A la demande de Reichel que préoccupait la récupération et la distribution du serum sec, très hygroscopique, Flosdorf (37) est amené en 1933 à étudier la méthode de dessiccation par sublimation d'abord pour chercher à éviter l'absorption de l'humidité de l'air par le serum sec lors de son transfert dans les ampoules définitives et à le protéger de l'infection. Devant les difficultés innombrables que présentait ce problème, il lui vint à l'idée de dessécher le serum directement dans les ampoules définitives destinées à l'emploi. Avec Mudd, ils résument en 1935, (37) dans un article intéressant, le résultat de leurs travaux sur la conservation sous la forme lyophile de serum, de solutions de protéines, de cultures bactériennes, de virus et d'autres substances biologiques. Le principe de leur méthode consiste en une congélation préalable rapide et à basse température, suivie d'une deshydratation rapide aussi, du produit qu'ils traitent. Ils signalent que la substance obtenue par ce procédé est un solide poreux, dont le volume est identique au volume du liquide initial et qui se redissout instantanément en eau distillée.

Ils congèlent le matériel à -78°C , puis adaptent rapidement les ampoules à l'appareil. La vapeur est collectée sous forme de glace dans un condensateur à -78°C , tandis que l'effet réfrigérant de la sublimation rapide maintient le matériel congelé pendant la dessiccation. Les ampoules sont finalement scellées sous le vide.

Ils décrivent plusieurs types d'appareils, tous du même modèle, formés d'une rampe munie de plusieurs embouchures qu'occupent les ampoules, d'un condensateur principal et d'un

condensateur secondaire, tous deux plongés dans un mélange réfrigérant que contient un vase de Dewar. Le condensateur secondaire, par une branche latérale, relie tout le circuit à pompe à vide Cenco-Hywac donnant une pression de l'ordre du millième de mm. Hg. Comme manomètre, ces auteurs utilisent la jauge de Mac Leod. Le temps nécessaire à la dessiccation est de une, deux, trois à vingt-quatre heures suivant la quantité de matériel. Leur publication se termine par la description d'appareils industriels permettant de dessécher plus de 200 ampoules simultanément.

A peu de mois d'intervalle, Elser, Thomas et Steffen (34) publient la méthode qu'ils emploient pour la conservation par la dessiccation de serum, de microbes et d'autres produits. Ils signalent que les anticorps, les antigènes congelés puis desséchés, restent inaltérés pendant des années, comme les bactéries et les champignons, tandis que les protozoaires et les spirochètes ne survivent pas à ce traitement.

Jerald G. Wooley (167) utilise le même appareil que Flosdorf pour la conservation de virus avec des résultats excellents, puisqu'il réussit à conserver du virus d'encéphalite pendant plus de 800 jours.

Andrucci (170) reprend la méthode de Pauli, mais utilise du serum de lapin, puis du sang défibriné qu'il dessèche à l'exsiccateur pendant 8 à 12 jours.

En 1936, Percival Hartley (59) propose une méthode simple de dessiccation des serums et autres solutions protéiniques. Il décrit en détail l'appareillage qui comprend un exsiccateur à vide où les liquides à traiter subissent l'action de l'anhydride phosphorique. Il déconseille l'acide sulfurique pour la dessiccation de substances biologiques actives, car il provoque une dénaturation de protéines, d'où perte d'activité. Les autres agents deshydratants ne semblent pas donner des résultats aussi favorables que l'anhydride phosphorique.

Hartley signale qu'il a avantage à amener préalablement le contenu des ampoules à une température aussi basse que possible, de même que la pression à 1 mm Hg ou moins encore. Si dans ces conditions l'évaporation est un peu plus lente, qu'en chauffant le matériel, le produit définitif acquiert une solubilité beaucoup plus grande. S'il est impossible de congeler le liquide à dessécher, on réduit lentement la pression dans l'exsiccateur et dès qu'on voit apparaître des bulles de gaz on supprime l'action de la pompe à vide et on laisse le tout pendant 24 heures, ce qui permet l'échappement des gaz dissous sans ébullition. On réduit alors la pression à moins de 1 mm. Hg. Le temps nécessaire à la deshydratation est encore long par cette méthode. La conservation du matériel se fait dans les ampoules qui sont alors scellées sous le vide ou après introduction d'azote.

En 1937, Swift et Homer (134) proposent deux méthodes de dessiccation partant des mêmes principes : le vide et une substance deshydratante, pour la première, le vide et un condensateur à froid, pour la seconde. Ces auteurs insistent sur la nécessité de maintenir la congélation pendant toute la dessiccation.

Reprenant la méthode de Swift, Hauduroy (63) dessèche, en 1938, 28 souches de Streptocoques divers en opérant de la façon suivante : des tubes à hémolyse sont remplis de bouillon, bouchés au coton, stérilisés puis ensemencés. Après un développement abondant, l'auteur centrifuge, jette le liquide surnageant et soumet le culot à une dessiccation aussi rapide que possible en présence d'anhydride phosphorique. Les tubes sont obturés sur le coton avec de la cire à cacheter. Il suffit pour obtenir une culture de verser quelques gouttes de bouillon sur le culot sec, d'agiter un instant puis d'ensemencer, ou de laisser la culture se développer dans le tube même. Les résultats sont concluants puisque des germes furent conservés plus d'un an et que, tout récemment, ouvrant des ampoules (datant de cette expérience) et repiquant leur contenu, nous avons obtenu des cultures de Streptocoques abondantes et ayant gardé leur caractère hémolytique, alors que les mêmes souches conservées par repiquages réguliers sur gélose ascite l'ont perdu. Huit ans de séjour à l'état sec et à la température ordinaire ont donc assuré une stabilité complète de ces germes.

En 1938 encore, Flosdorf et Mudd (38-41) donnent la description détaillée du procédé « cryochimique » de dessiccation où ils introduisent pour l'absorption des vapeurs d'eau des substances deshydratantes régénérables, procédé que la E. J. Stokes Machine Company applique immédiatement à la construction d'appareils qui rendent les plus grands services pour la dessiccation du serum, du plasma, de la penicilline et des cultures microbiennes en particulier.

L'année suivante, Knox (76) reprend la méthode d'Elser et Thomas et l'appareil de Flosdorf-Mudd qui du reste ne le satisfait pas. Il propose alors un autre modèle, en essayant de rapprocher autant que possible la surface d'évaporation de la surface de condensation. Il construit une partie métallique circulaire et creuse, avec des bras disposés en rayons de roue et destinés à recevoir les ampoules, ce qui a en outre l'avantage de les placer toutes dans les mêmes conditions vis-à-vis de la surface de condensation. Directement fixé à cette pièce métallique se trouve le condensateur principal, un tube d'évacuation pénétrant à l'intérieur du condensateur et partant de la partie supérieure de l'appareil conduit à un second condensateur fixé sur une pompe à Hg. et finalement à la pompe à vide Cenco Hywac. La mesure du vide se fait avec une jauge Pirani.

Le matériel est congelé préalablement à -78° C, en imprimant un mouvement de rotation aux ampoules lors de leur immersion dans le mélange réfrigérant, ce qui augmente la surface d'évaporation et diminue l'épaisseur du matériel.

Cette méthode et cet appareil proposés pour la dessiccation de tumeurs filtrables ont donné aussi d'excellents résultats dans la conservation de toute une série de produits biologiques et de bactéries.

En 1939 aussi, Greaves et Adair (55) utilisent un appareil comprenant un condensateur réfrigéré mécaniquement et une chambre à vide chauffée électriquement.

Dès ce moment la méthode de dessiccation par sublimation voit son emploi se généraliser et s'étendre à un nombre de plus en plus grand de laboratoires. Une série de travaux apportant des modifications et des précisions signale des résultats tous favorables.

Jerald G. Wooley (167) rapporte qu'il a pu conserver ainsi du virus d'encéphalite du type St-Louis, du virus de chorioménigite lymphocytaire pendant plus d'un an, réalisant ainsi une énorme économie de temps et d'argent en comparaison avec la méthode de culture sur tissus vivants.

Cooper et Grabill (24) publient une méthode de dessiccation par sublimation, avec intervention d'un deshydratant chimique.

Verge et Goret (160), à l'Ecole vétérinaire d'Alfort, utilisent la dessiccation rapide des ultravirus et les conservent très longtemps, sous forme de suspension de rate, de broyats d'aphte primaire pour la fièvre aphteuse, de suspension de pustules pour la variole aviaire et de sang pour la peste porcine.

A la suite de cette communication, Lépine et Sauter (82) rapportent quelques résultats de conservation de virus soit par congélation, soit par dessiccation. Frappé par la rapide destruction du virus rabique fixé par immersion dans la glycérine, Lépine avait montré en 1935 que la durée de la conservation peut être portée de 15 jours à 13 mois en congelant les moelles rabiques en eau physiologique. Ces auteurs essayent la dessiccation par sublimation en boîte de Pétri dont le contenu, une fois sec, est détaché au scalpel et conservé en ampoules scellées. Lorsque cette manœuvre de transfert est difficile, le fond de la boîte est garni de papier filtre sur lequel on étale la bouillie virulente. Ces papiers sont ensuite coupés aux ciseaux en languettes que l'on conserve en ampoules.

Une destruction importante du virus a lieu pendant le processus de la dessiccation, mais ensuite la stabilité est assurée : du virus rabique fixe, congelé à -20° C s'est conservé 883 jours, tandis que desséché sur papier filtre et conservé à $+4^{\circ}$ C il vit encore après 1394 jours. Les chiffres sont du même ordre de grandeur pour les autres virus (maladie d'Aujeszky, ectromélie,

louping-hill, herpès, encéphalomyélite équine américaine, chorioménigite lymphocytaire...). Lépine nous a confirmé lui-même ses résultats en nous signalant des durées de conservation plus longues encore.

Stephanopoulo, le grand spécialiste de la fièvre jaune, se montre un vif partisan de la dessiccation qu'il utilise avec succès depuis des années pour le virus de la fièvre jaune.

En 1942, A. Urbain, J. P. Thiery et R. Courtade (157) signalent que les repiquages de bacilles morveux sur pomme de terre meurent en moins d'un mois et en trois mois si l'on fait une suspension en serum de cheval. Utilisant alors l'appareil de Flosdorf-Mudd et desséchant une émulsion très dense de bacilles morveux en eau physiologique, enrichie de 1 % d'une solution de gomme arabique à 10% et à raison de un cc par ampoule, ils obtiennent la dessiccation complète en 18 heures, scellent les ampoules sous le vide et constatent que sous cette forme, le bacille morveux reste inaltéré durant plus de neuf mois, probablement plus longtemps encore.

H. Velu, L. Pigoury et R. Courtade (170) poursuivent cette recherche sur le bacille morveux et sa résistance à la dessiccation. Ils constatent qu'au delà de dix mois une partie des germes desséchés donnent encore une culture, tandis qu'après le 25^{me} mois tous sont morts. Ils remarquent en outre que les bacilles desséchés poussent souvent avec un retard de quelques jours et qu'aux environs du 25^{me} mois ils perdent leur virulence et leur pouvoir immunisant tout en présentant des modifications morphologiques.

P. Remlinger et J. Bailly (131) de l'Institut Pasteur de Tanger rapportent qu'en desséchant les virus sans congélation initiale, mais sous une cloche de verre en présence de chaux vive, ils obtiennent des résultats semblables à ceux que donne la sublimation. Ils signalent toutefois la nécessité d'une dessiccation rapide et remarquent que sous cette forme, le virus acquiert la possibilité de résister à des températures inhabituelles, plus de 100° C pour le virus rabique par exemple. Les divers virus résistent différemment à la dessiccation, mais tous présentent des survies extraordinaires.

En 1943, Rayner (128), développant la méthode de Hartley pour la conservation du serum, cite un ingénieux procédé pour dessécher de petites quantités de matériel. Il constate que l'évaporation ne suffit pas pour maintenir congelé le produit lorsque sa masse est très petite car l'apport de chaleur ambiante absorbée par les ampoules est trop abondant. Pour obvier à cet inconvénient, il propose de répartir la culture sur de petits morceaux de cellophane et donne les détails suivants : placer au fond d'une boîte de Pétri de 10 cm. de diamètre, un disque de papier filtre, sur lequel on dépose de petites pièces de cellophane

de 0,05 mm. d'épaisseur et d'une surface d'environ 2 cm², dimensions qui permettent de placer 24 de ces pièces sans qu'elles ne se touchent ni ne se recouvrent. Après stérilisation, le couvercle de la boîte de Pétri est légèrement maintenu ouvert par une petite pièce de bois. Déposer alors sur chaque parcelle de cellophane une goutte de culture en bouillon-sang au moyen d'une pipette Pasteur, puis placer le tout dans un exsiccateur à vide, en présence de chlorure de calcium. La congélation se fait rapidement et la dessiccation a lieu en 20 minutes ; chaque pièce de cellophane est ensuite transférée en ampoule et conservée sous le vide.

Pour la dessiccation de plus grandes quantités, il suffit d'utiliser de grands disques de cellophane d'environ 7 cm. de diamètre que l'on place dans l'exsiccateur à vide. Le vide est maintenu une nuit et permet d'obtenir un serum sec qui se détache facilement en pliant le cellophane et que l'on conserve en tubes stériles scellés sous le vide aussi.

J. B. Polding (120) de l'Institut vétérinaire de Mukteswar-Kumann aux Indes, propose cette même année encore une méthode simple de conservation des bactéries desséchées dans le vide. L'ampoule terminale consiste en tube à essais ordinaire contenant à partir du fond, 3 cm. de chlorure de calcium, 2 cm. de coton, 5 cm. de perles de verre et 1 cm. de coton. Le tube est fermé par un bouchon de caoutchouc contenant une aiguille à soupape. La culture de bactéries à conserver est légèrement émulsionnée avec un peu de sang stérilisé, dans lequel on introduit les perles de verre que l'on place ensuite dans les tubes et que l'on soumet au vide pendant un à deux jours. On enlève alors le bouchon de l'ampoule définitive, que l'on remplit comme nous venons de le dire en transférant les perles de verre dans le centre du tube au nombre de 10 à 12 : on conserve le matériel sous le vide, en reliant le tube au moyen de l'aiguille du bouchon à la pompe à vide, la valve est ensuite fermée de même que l'ouverture externe de l'aiguille que l'on obstrue avec de la cire à cacheter. Il est possible de retirer une seule perle de verre à la fois et à n'importe quel moment et d'obtenir ainsi 12 cultures à partir d'un seul tube et à différentes périodes.

Greaves (56) de 1942 à 1944 signale les bons résultats qu'il obtient par la dessiccation par sublimation de divers produits biologiques.

Flosdorf (45) en 1945, qui n'a pas cessé de s'intéresser à la dessiccation depuis 1933, fait une communication intéressante où il indique tous les avantages que cette méthode a fournis aux Alliés durant la dernière guerre en permettant la conservation de grandes quantités de serum et de pénicilline par exemple. L'application de ce procédé à la conservation des produits biologiques sur une échelle industrielle permet d'affirmer qu'il est

le procédé de choix pour la stabilisation de toute une série de produits labiles, y compris les bactéries.

Richard (130) en 1945, décrit un système de dessiccation et de conservation assez ingénieux qui consiste à partir de suspensions de germes en serum ou en lait par exemple, contenues dans des tubes à hémolyse fermés avec un tampon de coton. Les tubes sont placés dans un exsiccateur contenant du silicagel, après avoir été immergés dans un mélange réfrigérant à -78°C . Le dispositif est lui-même mis à la glacière à -10°C et relié à une pompe à vide. Dès qu'une pression de 0,001 mm. Hg est obtenue la pompe est arrêtée et le tout est laissé sous le vide pendant une nuit. Puis on peut sceller les ampoules.

Dans une publication très complète en 1945 encore, Flosdorf, Hull et Mudd (46) reprennent en détail le processus de la dessiccation et donnent de nombreuses précisions sur les dispositions à prendre à chacun des stades de la dessiccation. Ils signalent aussi les modifications que l'on peut observer dans les produits desséchés.

Glover (72), en janvier 1946, utilise l'appareil de Knox et dessèche des bacilles bovins et humains en suspension en eau physiologique, en eau distillée et en serum inactivé. Il constate que le matériel desséché subit une perte immédiate, mais qu'ensuite il reste très stable. Les mêmes suspensions conservées à -76°C ne montrent pas d'altérations après 180 jours.

Pour terminer et souligner encore l'importance qu'a prise la dessiccation par sublimation dans le problème compliqué de conservation des bactéries, citons enfin que, lors du Congrès du Conseil Scientifique du Centre de Collection de Types Microbiens à Lausanne, (175), cette méthode a été conseillée et adoptée, comme étant la meilleure actuellement connue. St-John-Brooks ne manqua pas de faire remarquer que toute la collection américaine et toute la collection anglaise sont conservées de cette manière. Prévot fit remarquer que la dessiccation ne donne pas encore d'excellents résultats avec les anaérobies et conseilla d'adapter, d'améliorer ce procédé pour le leur rendre applicable. Penso de Rome confirma aussi les avantages de cette méthode et nous apporta les photographies de l'appareil qu'il venait de faire construire selon les principes de l'appareil de Flosdorf.

Cet historique permet de réaliser le chemin parcouru dans le domaine de la conservation des bactéries. Ces généralités suffisent à montrer que deux méthodes surtout, la dessiccation par sublimation et conservation par protection des germes à l'huile de paraffine, sont à la base d'innombrables travaux. Actuellement, la première de ces méthodes l'emporte, grâce aux recherches de ces dix dernières années avec Flosdorf et Mudd, Knox, Elser et Hartley sans toutefois rejeter dans l'ombre les autres méthodes comme celle d'Ungermann et ses modifications

et celle de Puntoni (118-119) par exemple, qui sont nécessaires encore pour des germes tels que les anaérobies, et indispensables pour les laboratoires qui ne disposent pas de l'appareillage assez coûteux qu'exige la dessiccation par sublimation.

CHAPITRE TROISIÈME

CONSERVATION DES BACTÉRIES PAR LA DESSICCATION ET LE FROID

Nous avons adopté l'action du froid et de la dessiccation pour la conservation des bactéries. Ce fait va nous conduire à étudier maintenant la description de l'appareillage lui-même.

Comme nous l'avons déjà vu, la sublimation est la transformation que subit un corps quelconque qui passe de l'état solide à l'état gazeux, ou l'inverse, sans passer par l'état intermédiaire, c'est-à-dire l'état liquide.

Les principes généraux qui sont à la base de la dessiccation par sublimation sont au nombre de trois :

- 1) obtenir le taux maximum d'évaporation sans nuire à la stabilité du produit à dessécher ;
- 2) obtenir le taux maximum d'évaporation en établissant le courant de vapeur d'eau le plus intense de la surface d'évaporation à la surface de condensation ou d'absorption ;
- 3) obtenir le taux maximum d'évaporation dans les délais les plus courts et avec la plus grande économie.

Ces éléments vont exercer leur influence différemment suivant les produits à dessécher et leur quantité, ils détermineront donc le choix de l'appareil. Pour les petites quantités que l'on dessèche en bactériologie, il est intéressant d'avoir un appareil avec embouchure particulière pour chaque ampoule, en nombre variable suivant les besoins, tandis que pour les plus grandes quantités, il est préférable de placer toutes les ampoules dans une grande chambre de dessiccation, bien étanche même sous de très faibles pressions. Cette dernière solution modifie bien entendu les conditions de la dessiccation, car l'apport de chaleur ambiante est limité par les parois de la chambre, l'élévation de la température pendant la dessiccation est alors moins rapide, ce qui en prolonge tout le processus, à moins que l'on introduise des corps de chauffe, réglables à une température de -15°C ou -20°C , qui assurent le maintien de la température optima pour l'évaporation.

Une chambre de dessiccation a l'avantage de ne nécessiter qu'un petit nombre de joints, tandis que l'appareil à embou-

chures multiples présente autant de fuites possibles ; elle permet en outre la dessiccation simultanée d'un grand nombre d'ampoules ou d'une grande quantité de liquide. Notre appareil, réduisant la distance entre la surface d'évaporation et la surface de condensation au minimum, nous donne des résultats excellents malgré les douze joints qu'il nécessite.

L'évaporation est vivement accélérée sous l'influence du vide et trois procédés sont à notre disposition pour l'élimination des vapeurs d'eau :

- 1) la condensation à basse température ;
- 2) l'absorption par des substances deshydratantes ;
- 3) le pompage direct des vapeurs.

Quelles sont les raisons qui vont déterminer notre choix ?

Si la dessiccation a lieu occasionnellement avec de petites quantités de matériel, il convient d'utiliser une substance deshydratante qui est toujours prête à l'emploi et qui ne nécessite aucun entretien spécial. Mais une telle substance peut quelquefois donner des composés nuisibles pour les produits biologiques, s'épuiser si elle est trop longtemps en contact avec l'humidité atmosphérique, ou être encore trop coûteuse... Si l'on ne peut éviter tous ces désavantages, on utilisera alors le procédé de la condensation à basse température, de préférence au pompage direct qui nécessite l'emploi d'une pompe de très grande capacité.

La condensation des vapeurs d'eau est facilement obtenue avec un mélange réfrigérant fait de neige carbonique dissoute dans un solvant organique inoffensif, de l'acétone par exemple, qui donne une température de -78°C , même davantage dans certaines conditions. Toutefois l'anhydride carbonique est assez coûteux et ne convient plus pour les productions industrielles pour lesquelles on utilisera avec avantage des condensateurs à refroidissement mécanique. Nous avons utilisé l'anhydride carbonique dissout dans de l'acétone, contenu dans un thermos ordinaire qui suffit amplement à maintenir la température de -70 à -80°C , pendant quelques heures. Le commerce peut fournir l'anhydride sous deux formes, soit liquide sous pression en cylindre, soit sous forme de glace. Pour obtenir la neige carbonique à partir de la forme liquide en cylindre, il suffit de détendre brusquement CO_2 dans une peau de daim d'où l'on peut recueillir facilement la neige. Ce système a l'inconvénient de s'accompagner d'une assez grosse perte d'anhydride lors de la détente et de refroidir inutilement la tuyauterie adaptée au cylindre, mais il présente toutefois l'avantage d'éviter tout moyen spécial de conservation et d'être à proximité immédiate de l'appareil à dessiccation.

L'anhydride solide est fournie en blocs de 5 à 10 kg. que l'on conserve dans de grands thermos maintenus à la glacière, ce

qui n'évite cependant pas entièrement l'évaporation, minime du reste.

D'autres mélanges réfrigérants peuvent être utilisés avec d'autant plus de succès qu'ils sont plus froids : l'air liquide, l'hydrogène liquide par exemple. Ces produits ne sont utilisés qu'occasionnellement, pour l'expérimentation, car ils sont coûteux, plus difficiles à obtenir pour l'instant.

Ce procédé d'élimination des vapeurs d'eau par condensation fait intervenir toute une série de facteurs et quelques considérations physiques ne seront pas superflues. La dessiccation ne peut avoir lieu que si l'on maintient une différence entre la tension de vapeur à la surface d'évaporation et la tension de vapeur à un autre endroit du circuit, ici la surface de condensation. Il est évident que plus grande sera cette différence, plus intense sera l'évaporation et cette évaporation continuera tant que la tension de vapeur du condensateur sera inférieure à la saturation de la tension de vapeur à la surface d'évaporation. On voit d'emblée que les facteurs importants seront à part le degré du vide, la température et le rapport des surfaces d'évaporation et de condensation CO_2 permet d'obtenir un froid de -78°C , ce qui donne une tension de vapeur d'eau de 0,0005 mm. Hg à la surface de condensation qu'il faudra obtenir aussi grande que possible.

On peut observer des variations dues à :

- a) gaz non condensables contenus dans la vapeur d'eau ;
- b) le matériel de construction du condensateur ;
- c) l'épaisseur de la couche congelée du produit que l'on dessèche.

Le rôle des gaz non condensables est le plus important, il explique la différence entre la tension de vapeur et la pression totale et par là la température du produit qui s'évapore. Les deux autres éléments sont beaucoup plus contrôlables et susceptibles de modifications.

D'une manière ou d'une autre, ces variations se présentent avec une plus ou moins grande importance suivant les conditions de travail. La résultante de tous ces éléments s'exprime par la tension partielle de vapeur d'eau qui s'établit dans le système pendant la dessiccation.

Le taux maximum de dessiccation théorique se déduit des considérations précédentes et nous pouvons dire qu'il est déterminé par la différence entre la tension de vapeur à la surface de condensation et la surface du produit à évaporer. Le vide très poussé permet de diminuer la tension résiduelle due aux gaz non condensables aussi bas que possible pour s'approcher d'autant plus de ce maximum théorique, et de cette base on peut déduire que la tension de vapeur du produit à la température à laquelle

il doit être desséché détermine la température de maintien du condensateur, qui peut donc varier avec la température particulière à laquelle on maintient le matériel pendant la dessiccation.

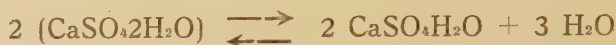
Cette différence de tensions de vapeur constitue la force active du processus, tandis que la pompe à vide ne sert qu'à lutter contre la tension d'air résiduel. L'observation montre que pour chaque température du produit à traiter, il y a une température minima du condensateur au delà de laquelle on n'améliore que peu la dessiccation.

Pendant l'opération, la surface se dessèche d'abord et la diffusion des vapeurs se fait bientôt à travers les pores de cette couche supérieure, ce qui entraîne une diminution de l'intensité de la dessiccation. Les lois des courants gazeux adiabatiques à travers des orifices permettant de déduire que lorsque la tension de vapeur de la surface de condensation égale le 55 % de la tension de vapeur de la surface d'évaporation, nous sommes dans des conditions optima de dessiccation. Ces déductions basées sur les conditions de filtration de la vapeur d'eau, expliquent la contradiction apparente qui veut que l'on n'obtienne pas un courant de vapeur plus intense en réponse à une différence de plus en plus grande des tensions de vapeur.

Un autre procédé d'élimination des vapeurs d'eau est celui de son absorption par des substances deshydratantes. Plusieurs produits tels que l'anhydride phosphorique, l'acide sulfurique, le silicagel ont été utilisés par divers auteurs et ont donné des résultats satisfaisants, mais ces produits sont, ou coûteux, ou non récupérables ou encore dangereux pour le matériel à dessécher. En 1938 Flosdorf et Mudd (40) introduisent le procédé cryochimique d'absorption des vapeurs d'eau, en utilisant des substances deshydratantes régénérables par chauffage. Ces substances présentent une élévation de température lorsqu'elles entrent en réaction avec l'eau ; cette production de chaleur, qui entraîne une élévation défavorable de la tension de vapeur du deshydratant pendant la dessiccation n'est pas éliminée d'emblée car ces substances sont de façon générale de mauvais conducteurs. Il importe donc de maintenir leur température aussi basse que possible par une réfrigération quelconque, surtout si les quantités d'eau absorbée sont importantes. Ce facteur défavorable est encore amplifié par l'élévation de la tension de vapeur que présentent certains absorbants lorsque la quantité d'eau absorbée augmente, comme le silicagel par exemple.

Dans le cours de notre expérimentation, nous avons utilisé du sulfate de calcium anhydre, pour adapter son emploi à un appareil que nous faisons construire et qui comporte une « marmite » d'une contenance de 50 litres environ, munie d'un manomètre et d'une rampe pourvue d'une trentaine d'embouchures pour les ampoules. Il est intéressant de suivre les détails de la

réaction d'absorption de l'eau avec ce produit. Le gypse dont la formule est $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se dissocie sous l'action de la chaleur en vapeur d'eau et en semi-hydrate (plâtre) et donne l'équilibre suivant :



Cet hydrate intermédiaire est une forme métastable, qui, en présence d'eau froide, s'hydrate en redonnant des cristaux de gypse.

Par cuisson du gypse à une température de 175 à 200° C ou par chauffage à 80° C dans le vide sec, on réalise une deshydratation totale. L'anhydrite obtenu diffère de l'anhydrite naturel orthorhombique par sa forme cristalline, par sa plus grande solubilité dans l'eau et surtout par ce fait qu'il se transforme facilement en semi-hydrate par fixation de vapeur d'eau et en gypse au contact d'eau liquide. On lui donne le nom d'anhydrite β , cette variété chauffée à 300° C dans l'air sec donne l'anhydrite α identique à la variété naturelle qui est stable et ne peut plus s'hydrater.

Pour régénérer pratiquement l'anhydrite qui s'est transformé en semi-hydrate, il suffit de chauffer sans dépasser la température de 200° C, car plus la température de deshydratation est élevée, plus l'hydratation ultérieure devient difficile.

L'anhydrite β est utilisable lorsqu'il y a peu de vapeur d'eau à absorber, car sa capacité ne dépasse guère le 6 % de son poids. Il a l'avantage de garder une tension de vapeur très basse même sous des vides très poussés.

Nous avons vu que dans l'élimination des vapeurs d'eau par la condensation à basse température, la température terminale du produit traité détermine la température optima du condenseur, ce facteur perd de son importance avec un deshydratant car sa tension de vapeur est toujours très basse par rapport à celle d'un produit desséché même non réchauffé.

Le troisième moyen d'éliminer les vapeurs d'eau est donc le pompage direct, qui paraît le plus simple au premier abord mais qui exige des pompes de très grande capacité, telles que les pompes à éjecteurs, pompes à huile dont il faut débarrasser l'eau de façon continue. Le volume occupé par la vapeur d'eau sous le vide est énorme, n'oublions pas que 25 cc. d'eau donnent à 0° C et sous un vide de 0,1 mm. Hg. 236.000 litres de vapeur, ce qui signifie un débit extraordinaire dans toute l'enceinte sous le vide et fait intervenir avec une acuité particulière les lois de la dynamique des fluides où le diamètre et la longueur des tuyaux jouent un rôle des plus importants.

Il est souvent nécessaire pour compléter la dessiccation par pompage direct d'utiliser une substance deshydratante qui est

absolument indispensable dès que la pression est inférieure à un micron Hg.

Que la vapeur d'eau soit éliminée par l'un ou l'autre des trois procédés cités, il faut que l'évaporation soit rapide. L'appareil doit être construit de façon à ne gêner en rien le courant de vapeur d'eau, surtout en ce qui concerne la tuyauterie qui doit être courte et de fort diamètre et ne présenter aucun obstacle. La résistance à un courant gazeux est inversement proportionnelle à la quatrième puissance du rayon et directement proportionnelle à la longueur du tuyau. Les ampoules terminales auront donc un diamètre intérieur au niveau du col d'au moins 4 à 5 mm., et ne dépasseront pas si possible une longueur de 5 cm. Les conduites allant au condensateur ou à la substance deshydratante seront, de même, les plus larges et les plus courtes possible. Si un tampon de coton est laissé, comme garantie de stérilité, dans le col de l'ampoule, il importera de l'introduire aussi lâche que possible, de façon à maintenir un diamètre réel suffisant, sinon la vapeur d'eau risque d'être arrêtée par ce filtre dans lequel elle se condensera et formera un bouchon imperméable, retardant considérablement la dessiccation du contenu de l'ampoule.

L'absorption de chaleur pour la sublimation est telle qu'elle maintient congelé le produit à dessécher, tant que l'évaporation persiste, que le produit ait été congelé préalablement ou non. Durant la première phase de la dessiccation, la pression maintenue à la surface d'évaporation correspond à la saturation de la tension de vapeur de la glace à la température du matériel, température qui dépend d'un équilibre entre la chaleur perdue par évaporation et la chaleur gagnée par apport de l'ambiance. A mesure que continue le processus la quantité d'eau diminue, la couche supérieure sèche s'épaissit et la vapeur s'échappe de plus en plus lentement ; finalement l'évaporation cesse, la pression devient égale dans tout le système et la température du matériel s'élève au niveau de la température ambiante. C'est à ce moment qu'apparaît l'importance d'une basse tension de vapeur dans le condensateur ou la surface du deshydratant, car plus la différence sera proche de l'optimum plus la deshydratation aura été complète.

Il est possible d'assurer la régulation de la température des ampoules soit de façon précise par un thermostat, soit de façon approximative en utilisant des ampoules de dimensions telles qu'un rapport favorable soit établi entre la surface d'évaporation et la surface adjacente du verre qui transmet la chaleur de l'extérieur. Il y a en outre un avantage évident à procéder à la congélation préalable du matériel en imprimant aux ampoules un mouvement de rotation de manière à obtenir une calotte interne du contenu dont la surface soit d'étendue sensi-

blement égale à la surface du contenant, car l'évaporation est intense et le besoin de chaleur qu'elle nécessite régulièrement compensé par l'apport extérieur. Pour une dimension donnée d'ampoule cet apport de chaleur de l'ambiance est constant et s'il dépasse les besoins de la sublimation, ralentie lorsque le produit est en couche épaisse et ne présente qu'une petite surface, on assiste à un dégel progressif et à l'ébullition du matériel. L'écume nuisible qui se forme alors vient imbiber les tampons de coton ou projette la suspension à l'extérieur de l'ampoule. Cette congélation préalable présente encore un autre avantage pour la conservation des bactéries en particulier : elle permet d'obtenir un volume terminal semblable au volume initial, d'éviter ainsi la concentration des bactéries, facteur léthal pour une grande partie d'entre elles, semble-t-il.

Le condensateur ou le deshydratant avec la température et la teneur en eau de la substance à dessécher déterminent la tension partielle de vapeur du système, tandis que les fuites et les gaz non condensables déterminent la tension partielle d'air résiduel. Il n'est donc pas nécessaire que la pompe produise une pression inférieure à la tension de vapeur dans le condensateur, mais il suffit qu'à une température donnée elle prévienne la concentration des gaz non condensables, car si le vide est trop poussé on assiste à une évaporation à partir du condensateur. D'autre part la température du produit à dessécher doit être bien inférieure à la température de congélation de ce produit pour éviter la séparation eutectique du matériel qui sera la cause d'une fusion à une température inférieure même à celle de congélation. Cette température de congélation oscille entre 0 et -1° C pour la plupart des produits biologiques, à $-0,56^{\circ}$ C pour le serum par exemple qu'il suffira donc de maintenir entre -9 et -12° C. Il importe de ne pas abaisser cette température plus bas que nécessaire, car la tension de vapeur diminue d'autant et empêche une évaporation maximum.

Certains auteurs, après la découverte précise des conditions critiques relatives à l'apport de chaleur latente de sublimation, c'est-à-dire à l'apport de l'énergie nécessaire à la sublimation, pensent qu'il est utile de procéder à un chauffage du produit congelé, sans toutefois en amener la fusion. C'est ainsi que plusieurs procédés trouvent leur application dans la réalisation de cette idée : résistance électrique, chaleur d'induction, haute fréquence, lampes à rayons infra-rouges, chaleur diélectrique, courant d'eau chaude, de vapeur et contribuent à raccourcir le temps de dessiccation. Il importe alors, lorsque cette dernière touche à sa fin, et que le refroidissement par évaporation diminue, de supprimer l'apport de chaleur artificiel de façon à maintenir le produit sec à une température inférieure à sa température limite de sécurité et de stabilité.

APPAREIL UTILISÉ :

L'appareil utilisé ne diffère pas dans ses grandes lignes de celui que Knox (76) a proposé en 1939, tout en présentant quelques petites modifications. La partie centrale est constituée par une pièce métallique en bronze, circulaire, d'un diamètre de 16 cm. environ, creusé et dont les parois épaisses de 2 cm. sont garnies de bras latéraux disposés en rayons de roue au nombre de six. Le diamètre intérieur des bras latéraux est de 13 mm., une petite réduction à 10 mm., située à 1,5 cm. de profondeur constitue un rebord empêchant les ampoules d'être aspirées lors de la diminution de la pression. Chacun des bras porte un filetage externe correspondant au filetage interne d'un capuchon métallique, permettant le passage du col des ampoules, capuchon qui, grâce à la présence d'une rondelle de caoutchouc assure l'étanchéité quasi absolue des joints. Ce mode de fixation, utilisé par Elser, Thomas et Steffen permet un ajustage rapide des ampoules et diminue au maximum les possibilités de fuite.

Immédiatement au-dessous de la pièce métallique circulaire se trouve le condensateur principal, dans lequel la vapeur d'eau est recueillie sous forme de glace. Constitué par un cylindre de verre, long de 12 cm. et large de 6 cm., il est fixé à la partie centrale avec un capuchon de même type que les précédents qui vient comprimer le rebord du cylindre au moyen d'une rondelle de caoutchouc.

Ce condensateur est plongé jusqu'au niveau du capuchon métallique dans un mélange réfrigérant constitué par de l'acétone saturé d'anhydride carbonique en glace et que contient un vase Dewar ou un simple thermos à large ouverture.

L'immersion doit être lente au départ pour éviter une ébullition trop intense du mélange réfrigérant, qui risque de jaillir hors du thermos lors du refroidissement du condensateur.

A la face supérieure de la pièce principale de laiton, une ouverture de 2,5 cm. de diamètre permet le passage d'un tube de métal, qui se prolonge jusqu'à l'intérieur du condensateur. L'autre extrémité du tube est reliée soit à un condensateur secondaire soit directement à la pompe à vide. Un robinet permet d'isoler tout l'appareil de la pompe. Si l'on utilise un condensateur secondaire, on adapte ce dernier à une petite pompe à diffusion de Hg. Le condensateur principal retient pratiquement toute la vapeur d'eau, la fonction du condensateur secondaire sera donc d'arrêter les vapeurs de Hg.

Les ampoules que nous avons utilisées nous ont été imposées par les restrictions touchant l'industrie du verre. C'est en scellant une extrémité de la partie non étirée d'une pipette Pasteur récupérée que nous avons fait des ampoules dont la forme rappelle celle d'une allumette longue de 7 à 8 cm., pourvue

d'un col d'un diamètre de 5 à 6 mm. Un renflement terminal d'une section de 7 à 8 mm. permet la répartition de la suspension microbienne en couche mince. Par une réduction dédoublée, fixée au niveau des bras latéraux, nous pouvons dessécher douze ampoules simultanément.

Pour éviter la pollution des suspensions de bactéries nos ampoules stériles sont bouchées par des tampons de coton peu dense pour ne pas retarder l'évaporation et assurer tout de même la protection désirée. Le scellage des ampoules peut être fait sous le vide, ce qui entraîne une entrée brusque d'air lors de l'ouverture des ampoules et une grande probabilité d'infection, à moins de procéder à cette ouverture dans la flamme. Nous avons évité cet inconvénient en remplissant les ampoules d'azote à la pression ordinaire. Ce dernier procédé a l'avantage en outre d'éviter un resserrement du col des ampoules avant la dessiccation, resserrement obligatoire en cas de scellage sous le vide, et de supprimer ainsi un obstacle supplémentaire au passage des vapeurs d'eau. Nous avons choisi l'azote comme gaz inerte, car l'air ordinaire est défavorable de même que l'oxygène et l'hydrogène ou l'anhydride carbonique.

MANOEUVRE DE LA DESSICATION

L'opération de la dessiccation se fait de la façon suivante : le matériel à traiter est réparti à raison de 0,1 à 0,2 cc. par ampoule que l'on fait en douze exemplaires et que l'on immerge, en leur imprimant un mouvement de rotation, dans un mélange réfrigérant à -78° C. Dès que la fixation aux embouchures est terminée, la pompe est mise en action et le condenseur immergé dans le vase de Dewar que nous élevons progressivement et automatiquement grâce à un petit curseur sur roue dentée. En quelques minutes, la pression atteint 0,05 mm. Hg., puis 0,01 mm., l'évaporation se produit et le refroidissement qui lui est dû maintient le matériel congelé. Un givre abondant se forme sur les parois externes des ampoules, provenant de la condensation de l'humidité atmosphérique.

En 30 minutes environ, la température des ampoules remonte lentement pour atteindre la température ambiante, le givre se fond et le matériel apparaît alors comme un produit poreux qui se détache de la paroi des ampoules. On constate aussi à la fin de la dessiccation une diminution de la pression qui peut alors atteindre le millième de mm. Hg. Pour assurer une dessiccation complète, on laisse encore fonctionner l'appareil pendant 20 à 30 minutes. Nous introduisons alors de l'azote pur, sec et stérile par une embouchure latérale, ce qui nous permet de sceller les ampoules à la pression ordinaire. Cette entrée d'azote doit être lente pour éviter l'infection ou le refoulement brusque des tampons de coton que nous laissons dans le col

des ampoules. Ce retour lent à la pression est assuré par un tube capillaire qui freine l'entrée de l'azote et rétablit l'équilibre avec la pression atmosphérique en dix minutes environ. Les ampoules sont alors scellées après retrait du bouchon de coton, étiquetées puis conservées à la glacière si possible.

La fin de la dessiccation ne signifie pas que toute l'eau du produit à dessécher a été éliminée et nous n'avons pas à le regretter, car, comme pour les produits biologiques, la stabilité, la solubilité et l'activité de la suspension bactérienne desséchée exige une certaine teneur minimum en eau. Nos observations ne portent pas encore sur un temps assez long pour dire quelle est la teneur en eau favorable pour les bactéries, mais nous pouvons supposer d'ores et déjà que cette teneur se situe aux environs de 0,5 à 1 %.

Lorsque le matériel est desséché par sublimation, le poids final du produit sec ne dépend pas uniquement de la température de ce produit pendant la dessiccation, mais aussi de la tension de vapeur limite que l'on peut obtenir dans l'appareil. Comme on l'a vu une température de -78° C donne une tension de vapeur de 0,0005 mm. Hg. qui correspond à peu près à ce que donne l'anhydride phosphorique ou la chaleur du four à 110° C. Si la dessiccation a atteint un taux maximum dans ces conditions on ne doit pas assister à une augmentation de pression dans les ampoules scellées. Mais comment surprendre cette augmentation ? On peut utiliser des décharges à hautes fréquences provoquant une coloration verte à très basse pression et qui donnent une coloration rouge lorsque la pression atteint 0,0005 mm. Hg. Si les ampoules ne sont pas scellées sous le vide, on peut y introduire une substance déshydratante qui se colore en réabsorbant de l'eau et signale de cette manière une dessiccation insuffisante ou une porosité des parois de l'ampoule.

Le temps nécessaire pour une dessiccation complète d'une quantité de 20 cc. d'eau est d'environ 14 à 16 heures avec notre appareil, tandis que 0,5 à 1,5 cc. de liquide réparti en plusieurs ampoules, sont desséchés en 40 à 50 minutes. La pression diminue avec l'augmentation du degré de dessiccation et le degré de cette diminution peut constituer un indicateur utile de cette deshydratation qui dépend des capacités de la pompe et des fuites de l'appareil. Moins il y a d'air résiduel, dû aux fuites de l'appareil, plus cette pression terminale est équivalente à la tension partielle de vapeur d'eau. C'est donc, dans ces conditions seulement, que la diminution de pression constituera un indicateur valable du degré de deshydratation.

A titre indicatif, la dessiccation par sublimation comme elle est décrite ci-dessus, permet d'éliminer le 99,96 % de l'eau.

Nous n'insisterons pas sur les divers modèles de pompe à vide dont le choix dépend de la capacité de l'appareil et de

son principe d'absorption des vapeurs d'eau. Les pompes rotatives à palettes sont excellentes, donnent un vide très poussé qu'il est possible de renforcer encore par l'adjonction d'une pompe à diffusion de Hg. et permettant d'atteindre facilement, par exemple, la pression limite de 0,0005 mm. Hg d'un système qui utilise un condenseur à -78° C. La capacité d'une pompe est un facteur volumétrique, sans rapport avec le degré de vide, sauf tout près du vide limite de la pompe.

MESURE DE PRESSION

Quelques indications concernant la pression et sa mesure termineront ce chapitre de sèche technique.

L'unité adoptée pour les mesures du vide est le millimètre Hg. qui correspond à la pression exercée par une colonne de mercure de 1 mm. de hauteur et de 1 cm² de section. Certains auteurs font leur notation en micron (1/1000 de millimètre). La barye, unité CGS, équivaut à 0,75 mm. Hg. et représente la pression exercée par une force de une dyne appliquée sur une surface de 1 cm². Toute une série d'appareils peut être utilisée pour ces mesures : le manomètre tronqué, le manomètre à branche inclinée pour des pressions de 20 à 0,1 mm., le tube témoin basé sur la lueur apparaissant entre l'anode et la cathode dans un vide poussé, la jauge de MacLeod, basée sur l'application de la loi de Mariotte, le manomètre de Pirani, dont le fonctionnement est basé sur la relation existant entre la pression d'un gaz raréfié et sa conductibilité thermique, le manomètre à ionisation basé sur la conductibilité électrique des gaz ionisés, le manomètre de Phillips basé sur la résistance à la marche des électrons entre deux électrodes. Nous avons utilisé un appareil se composant d'un baromètre écourté et d'un manomètre à compression de Gaede, dont les indications nous permettent des lectures entre 50 mm. et 0,001 mm. Hg.

QUATRIÈME CHAPITRE

ANALYSE EXPÉRIMENTALE DE LA DESSICATION PAR SUBLIMATION

Il importe d'aborder sans tarder l'étude des modifications que peut subir le produit que l'on dessèche. Ces modifications sont de la plus haute importance pour la conservation des bactéries et méritent une étude plus vaste et de beaucoup plus longue durée que celle à laquelle nous nous sommes livrés.

De façon générale, on n'observe pas d'altérations chimiques, tandis qu'au point de vue physique, on observe par exemple une modification immédiate des colloïdes lyophobes alors que les colloïdes lyophiles, tels que serum, gélatine, gomme arabique acquièrent une solubilité remarquable, quelquefois supérieure à

celle qu'ils avaient avant d'être desséchés : ainsi la gélatine devient soluble dans l'eau froide.

Au point de vue biologique, les produits desséchés par sublimation ne présentent que peu ou pas de modifications dans leur activité : la pénicilline garde son pouvoir bactériostatique, la tuberculine son activité, le serum son complément ou son pouvoir immunisant, la vaccine sa valeur, et, ce qui nous intéresse, les microbes leur vitalité et leurs caractères, certains virus leur virulence et leur vie. Mais éviter d'insister sur les conditions particulières nécessaires à de tels résultats, en particulier pour les bactéries, serait une erreur. Rôle des substances dans lesquelles sont placées les bactéries : Une suspension de staphylocoques en eau distillée ne résiste pas à la dessiccation, la mortalité des germes s'élève à 90-100 % ; tandis qu'une suspension en serum ne voit sa perte s'élever qu'à 10-15 %. Pourquoi ?

La congélation, puis la dessiccation des microorganismes ne se font pas sans lourde perte si une protection n'est pas accordée à ces derniers par diverses substances dont le rôle reste encore à préciser, mais dont plusieurs auteurs ont déjà signalé l'importance. Les substances protectrices utilisées sont en général du serum de cheval ou de bœuf stérile et inactivé, du blanc d'œuf, du lait écrémé, du liquide d'ascite...

QUEL EST LE MÉCANISME DE CETTE ACTION ?

Cherchant à savoir si le serum agissait favorablement grâce aux propriétés spécifiques de ses protéines ou grâce à ses propriétés générales de colloïdes, nous avons utilisé parallèlement de la gomme arabique et nous nous proposons d'essayer d'autres colloïdes tels que de l'amidon, de la gélatine, du polyanéthol-sulfonate de soude de même qu'un mélange des acides aminés essentiels des protéines plasmatiques. Les solutions concentrées, à 50 % par exemple, de divers sucres semblent donner aussi une protection efficace. Nous résumons nos essais à ce propos dans le tableau suivant :

Germes	Suspension de germes diluée 120 000 fois	Ensemencement de la suspension après :														
		sans traitement			congélation brusque à -70 C pendant 5' dégel lent			congélation brusque à -70 C pendant 5' dégel rapide			congélation brusque à -70 C pendant 3' dégel rapide			dessiccation par sublimation		
Staphy- locoque	Nombre d'heures de croissance	après			après			après			après			après		
		18 h.	28 h.	40 h.	16 h.	28 h.	40 h.	18 h.	30 h.	44 h.	18 h.	30 h.	44 h.	18 h.	30 h.	44 h.
	suspension en eau distillée	16	16	28	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0
	suspension en eau physiol.	14	26	59	0	4	13	0	1	1	3	7	7	0	0	0
	suspension en serum	70	73	75	59	63	65	63	65	69	65	72	73	50	63	70
suspension en gomme arabique à 10 %	67	70	74	52	53	65	30	33	34	40	43	45	28	29	33	

Les chiffres que contiennent les cases correspondent au nombre de colonies obtenues en ensemençant sur gélose 0,1 cc. de chacune des suspensions. Nous avons obtenu des chiffres identiques avec le colibacille par exemple. D'autres essais du même ordre permettent de dire que la conservation des bactéries est défavorablement influencée par l'eau physiologique, l'eau distillée, le bouillon... Les résultats favorables donnés par la dessiccation de suspensions en bouillon, centrifugées, ne seraient-ils pas dus à la protection qu'exercent peut-être les microbes morts sur les vivants ? Il semble donc que les colloïdes exercent une action protectrice qui ne pourra être définitivement admise qu'après de nombreux essais encore. Si par exemple, la gomme arabique, holoside à grosses molécules, se révèle aussi favorable pour la conservation de longue durée des bactéries que le serum, son utilisation conduirait à une simplification intéressante du travail : la solution est facile à obtenir, la stérilisation peut se faire à l'autoclave tandis que le serum est beaucoup plus difficile à manier. Il importe d'en déterminer encore la concentration et le pH les plus favorables à la conservation et à la protection des bactéries. Il est certain que d'autres colloïdes hydrophiles pourront trouver un large emploi dans le même but.

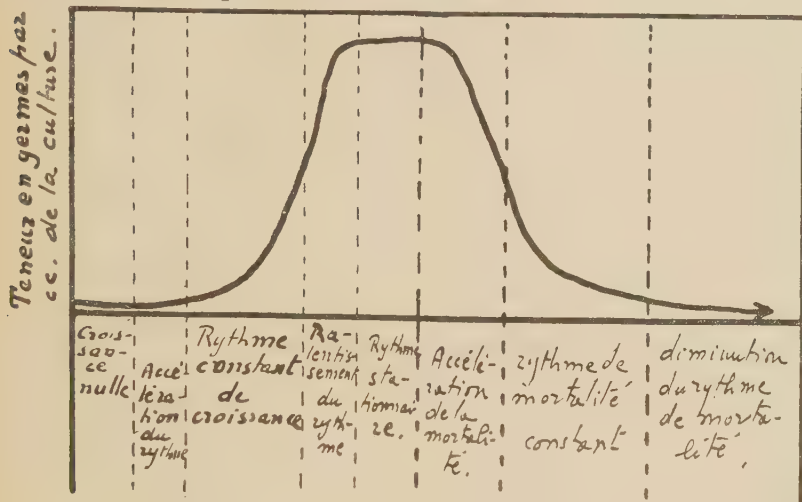
On peut se demander comment le serum exerce son action protectrice ? Certains auteurs ont parlé de « colloïde protecteur ». Il ne s'agit certainement pas de cela au sens donné habituellement à cette expression, ces mots ont un sens précis désignant l'action d'un colloïde protéinique par exemple sur un autre colloïde, un sel d'or si l'on veut, action due à l'intervention de deux facteurs de stabilité : la charge électrique des particules d'or et l'enveloppe aqueuse du colloïde protecteur ; ce mode d'action n'est certainement pas celui qui s'exerce à l'endroit des bactéries. Quelle hypothèse faut-il envisager ? Celle que le colloïde forme peut-être une capsule autour des bactéries, ou un reticulum dont les mailles protégeraient les germes ? Des expériences nombreuses devront le prouver encore.

Les microbes desséchés, sous quelle forme se présentent-ils ? Sont-ils vraiment deshydratés ou n'est-ce que le contenant qui l'est ? Autant de questions auxquelles nous ne pouvons répondre que par des hypothèses, car l'examen au microscope de suspensions en serum desséché ne donne pas d'éléments sûrs. Des pesées exactes seules pourront donner des chiffres dont la comparaison aidera à la solution de ce problème.

Rôle du froid : nous avons vu au deuxième chapitre que le froid appliqué brutalement n'a pas d'action nocive, pour autant que la température ne soit pas proche de 0° C.

Rôle de la dessiccation par sublimation sur la vitalité : dans les suspensions en substances protectrices la mortalité des germes durant la dessiccation est faible et se trouve osciller entre 10 et

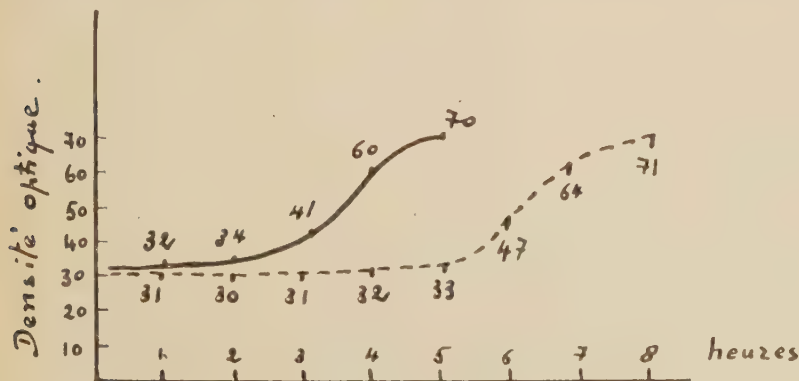
15 %. On observe pourtant une légère modification dans la courbe de croissance : des mesures de la densité optique de cultures en bouillon, au néphélomètre, d'après la méthode de Monod, montrent un allongement important de la phase de latence, qui peut passer de 2 à 6 heures.



→ Temps.

Courbe normale de croissance des microbes

Le repiquage de suspensions de colibacilles, dilué au 1/1000000 en serum, montre un allongement d'environ 4 heures pour l'échantillon desséché.



— courbe avant dessiccation

--- courbe après dessiccation.

La même recherche effectuée par la numération des colonies sur plaque de gélose nous a donné une phase de latence de plus de 2 jours: pour certains germes tels que le coli et les Eberthella.

	Heures	12	24	48	72
culture sur gélose	suspension en serum sans traitement	120	1400	1570	1600
nombre de colonies	suspension identique desséchée par sublimation	0	0	40	1321

Cet allongement est la seule modification que présente la courbe de croissance. Les phases suivantes inchangées sont simplement décalées.

Rôle sur les propriétés biologiques: Les caractères des bactéries restent inaltérés ou présenteront tout au plus quelques atténuations qui ne tardent pas à disparaître lors des premiers passages. La faculté de fabriquer du pigment vert, par exemple, peut avoir disparu chez le *B. pyocyaneus* lors du repiquage de la culture sèche, mais réapparaît au deuxième passage. Nous avons cependant noté la disparition définitive du pouvoir hémolytique de certains streptocoques.

Les modifications et les dégâts que peuvent subir les bactéries, semblent se produire au cours du processus de la dessiccation tandis que la conservation est accompagnée d'une stabilité quasi absolue, pour autant que les conditions extérieures ne se modifient pas.

Nous desséchons actuellement tous les germes de la collection du Centre et nos résultats ne peuvent que nous faire admettre et conseiller la dessiccation des bactéries par la sublimation.

Limites actuelles de la méthode: Les germes aérobies semblent tous résister au processus de la dessiccation, des hématozoaires même ont été maintenus vivants plus d'un an et demi de cette manière par Pauli en 1932. Weymann, en outre aux Etats-Unis, a réussi l'an dernier à conserver des hématozoaires et à faciliter ainsi leur transport. Il est certain que la conservation de telles cellules apporterait des données entièrement nouvelles de biologie générale et permettrait des applications pratiques d'un intérêt extraordinaire. La dessiccation des germes anaérobies paraît encore difficile et Prévot nous a confirmé ses échecs avec la sublimation: il est probable que les manipulations de transfert des germes dans les ampoules en présence de serum, constituent l'obstacle principal, car elles permettent à l'oxygène atmosphérique d'exercer son action néfaste. Malgré ces inconvénients

nous avons pu dessécher quelques germes anaérobies fragiles, aimablement mis à notre disposition par le Dr Prévot et en obtenir des cultures positives à partir de quelques ampoules. Il sera peut-être utile, sinon nécessaire, de faire la culture des germes anaérobies en milieu riche en substance protectrice et directement dans l'ampoule terminale qu'on pourra centrifuger pour en éliminer l'excès de liquide. Il suffira alors de dessécher rapidement un culot de germes concentrés.

La méthode de dessiccation par sublimation a vu son application s'étendre à des domaines de plus en plus divers depuis son introduction dans la pratique courante par Shackell en 1908. La conservation et la stabilisation de toute une série de produits biologiques représentent les résultats précieux d'un procédé dont les éléments transforment complètement de nombreuses données courantes et soulèvent des problèmes passionnants. Toute son influence s'exerce dans le travail du physiologiste, du biochimiste, du pharmacologiste, du médecin, du bactériologue. Les vitamines, les enzymes, les hormones, les bactéries, le serum et le plasma spécialement au cours de la dernière guerre, ont vu leur conservation largement assurée dans le temps et dans l'espace, grâce à l'application quasi-industrielle d'un principe qui, après avoir éveillé la curiosité de quelques savants au début du XIX^{me} siècle, dut attendre une centaine d'années pour devenir le point de départ de nombreux travaux et constituer la base d'une méthode de conservation dont l'emploi de plus en plus généralisé va modifier l'aspect de nombreux domaines des sciences et de l'industrie.

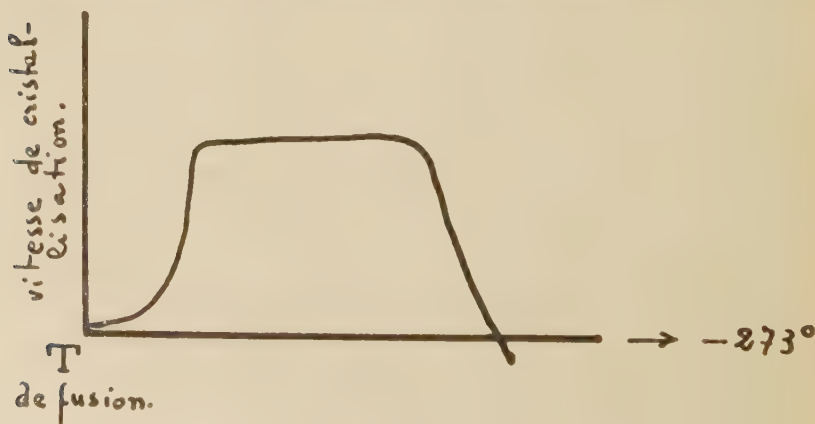
La bactériologie ne pouvait que profiter de cette acquisition, dont nous pouvons dire qu'elle constitue le procédé de choix de conservation des bactéries. Elle maintient pendant des années leur vitalité, leurs propriétés biologiques et physiochimiques avec une régularité inconnue jusqu'à ces dernières années, et ceci grâce aux nombreuses améliorations que les expérimentateurs, anglo-saxons surtout, lui ont apportées depuis une décade. Elle peut en outre s'appliquer avec succès à la concentration de substances thermolabiles.

A côté de son utilité cette méthode présente un intérêt scientifique manifeste et propose à notre attention quelques remarques générales. Si nous acceptons d'emblée la conservation de produits biologiques desséchés de cette manière et le maintien de leur activité, pharmacodynamique par exemple, nous éprouvons une certaine surprise en voyant des microorganismes, cultivés déjà sur un milieu artificiel, soumis à une température de —80° C et plus, desséchés puis finalement réensemencés, retrouver leur vitalité première et leurs caractères originaux.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

Les microorganismes ne manifestent les propriétés vitales dont ils sont doués que sous l'influence de l'humidité, de la chaleur, de la présence d'oxygène, aérobie ou non, de l'apport d'aliments ; dès qu'une ou plusieurs de ces conditions cessent, la manifestation vitale cesse parce que le phénomène physico-chimique qui lui est parallèle s'arrête. Pour les bactéries, la suppression de ces conditions ne signifie pas la mort, mais « suspension de vie » selon l'expression de Becquerel, ou « vie latente » ou « anabiose » encore selon Guyenot : l'humidité est supprimée, l'oxygène éliminé, la température est celle de la glacière et les aliments ne peuvent être utilisés faute d'humidité. Le métabolisme des germes est donc réduit à un minimum très proche de zéro, et nous devons avouer que le maintien de la vie dans de telles conditions, pour aussi certain qu'il est, n'en est pas moins surprenant. Chacune des étapes du processus de la dessiccation est un sujet de recherches et touche aux problèmes importants de la nature de la matière vivante, de son origine et des limites physico-chimiques de la vitalité. Il est peut-être intéressant de s'évader un peu à propos de l'une ou l'autre de ces étapes.

La température de l'hélium liquide ($-271,25^{\circ}$) n'atteint pas la vitalité des bactéries, ni celle de certains organismes plus complexes, tels que des mousses, des lichens, des graines... si l'on observe tout au moins certaines conditions expérimentales. Un fait important découle de l'expérience : la nocivité des basses températures croît avec la lenteur de leur application. La rapidité de l'application du froid et son rôle sur la cristallisation de nombreuses solutions salines sont connus : au point de fusion la vitesse de cristallisation est nulle, puis si la température diminue, cette vitesse croît rapidement pour atteindre une constante, puis diminuer ensuite, ce qui donne la courbe suivante :



En dessous d'une certaine température qui varie pour chaque solution, la vitesse de cristallisation est nulle. La cristallisation est donc impossible aux basses températures, probablement à cause d'une viscosité considérable qui rend impossible le mouvement des molécules et leur disposition cristalline. Les températures proches du point de fusion déterminent la formation d'un petit nombre de cristaux, dont la croissance est rapide, tandis que des températures nettement inférieures entraînent l'apparition d'un très grand nombre de noyaux de cristallisation et la formation de cristaux de plus en plus petits. Lorsque la température continue à s'abaisser, les cristaux ne se forment plus et la matière prend l'aspect vitreux, qui constitue un véritable quatrième état de la matière. Cet état est du reste connu depuis des siècles chez les silicates, dans le verre. A la fin du siècle dernier toute une série de substances furent vitrifiées par Tammann (158), tandis que plus récemment, Luyet (83-87) obtenait la vitrification de colloïdes aqueux, du protoplasma et d'un grand nombre de solutions de corps très divers.

Une substance vitrifiée se distingue de la même substance cristallisée par le fait qu'elle est amorphe et qu'elle ne présente aucun ordre déterminé dans la disposition des molécules. Elle a la propriété d'être isotrope, elle est douée donc de mêmes propriétés physiques dans toutes les directions, tandis que la plupart des cristaux sont anisotropes. En lumière polarisée, une substance vitrifiée, entre nicols croisés, ne laisse pas passer la lumière, tandis qu'un cristal le fait.

La température de vitrification n'est pas un point fixe comme celles de fusion ou d'ébullition, mais elle s'étend sur un intervalle, souvent considérable (de -273 à 1000° C pour le verre). L'état vitreux ne correspond pas à la surfusion, car le contact avec un cristal de la même substance n'entraîne pas la cristallisation de cette dernière. Il est possible d'obtenir l'état vitreux par l'application très rapide du froid, ce qui évite la cristallisation et surprend les molécules à l'endroit où elles sont. La congélation est donc impossible parce que la température est trop basse et trop rapidement appliquée. On peut donc cristalliser un produit de deux manières : soit en le réchauffant s'il est à l'état vitreux, soit en le refroidissant s'il est liquide, tandis que la vitrification ne peut se faire qu'en partant directement de l'état liquide, sans passer par la cristallisation. L'air liquide constitue le milieu approprié pour la vitrification que l'on peut aussi obtenir avec un mélange d'anhydride carbonique et d'acétone. La rapidité du refroidissement dépend aussi de la masse à refroidir et de la surface ; si la quantité est trop grande, la couche extérieure est la seule à se vitrifier, tandis que le centre cristallise lentement, ce qui limite la vitrification. Pour les colloïdes en outre la teneur

en eau semble déterminer la possibilité ou l'impossibilité de la vitrification.

Une grande quantité de petits cristaux se forme dans un corps à l'état vitreux dont la température s'élève et une perte de la transparence s'établit, due soit à la dimension des cristaux soit à leur multiplication. Les substances à poids moléculaire élevé (gélatine, albumine, gommes, dextrines...) ont des températures de vitrification élevée (aux environs de -10° C.), tandis que la glycérine et le formol dévitrifient à -60 et -70° C.

La vitrification de la matière vivante a été essayée et obtenue, elle éclaire d'un jour nouveau toute une série de données. Va-t-elle nous apporter quelques lumières sur l'état de « vie suspendue ? » On sait qu'après dessiccation, des bactéries résistent aux températures les plus basses que l'on puisse fournir, cette résistance a été observée aussi chez des moisissures, des spores, du pollen, des lichens et des mousses et chez des animaux, les nématodes par exemple. La plupart de ces organismes non desséchés succombent à des températures de quelques degrés au-dessous de zéro, par cristallisation de l'eau. Il importe donc de réaliser, en évitant la cristallisation, une vitrification de la manière vivante pour déterminer l'action de l'eau et en préciser le rôle. Les essais de vitrification de protozoaires de Luyet (82-87) : rhizopodes, ciliés et flagellés n'ont pas permis de raviver un seul organisme, tandis que des myxamibes de myxomycetes ont survécu. Des spermatozoaires de grenouille, plongés dans une solution de sucre à 15 % restent vivants dans une proportion de 1 %, qui peut monter jusqu'à 20 % si la concentration du sucre atteint 30 ou 40 %.

L'état vitreux semble compatible avec la vie et l'on comprend alors pourquoi des températures de zéro sont nuisibles pour les organismes vivants, en provoquant une séparation de l'eau des matières albuminoïdes, eau qui se rassemble alors entre les fibres des tissus, y forme de gros cristaux de glace, qui à la décongélation donnent de l'eau distillée. L'action rapide de basses températures diminue fortement les dommages : l'eau n'a pas le temps de se séparer des protéines cellulaires, de quitter la cellule, de former de gros cristaux qui traumatisent les membranes des cellules, car même si la vitrification n'a pas lieu, les cristaux sont infiniment plus petits. La congélation brusque et rapide fixe les éléments vivants dans leur position moléculaire initiale.

Toutefois l'état vitreux ne suffit pas à résoudre le problème du maintien de la vitalité des bactéries aux basses températures. Car les conditions de congélation initiale de la méthode de dessiccation par sublimation n'évitent certainement pas la cristallisation et même si elles l'évitaient, le réchauffement pendant le processus entraînerait de toute manière la dévitrification.

Il est possible que les molécules d'eau qui participent à la constitution de la matière vivante, violemment arrachées par la cristallisation, provoquent la mort de cette matière, tandis que si elles ne sont que légèrement déplacées par un début de cristallisation, ou une cristallisation microscopique, le protoplasma n'est pas ou peu atteint. Si cela correspond à la réalité, l'eau joue alors un rôle fondamental dans la structure de la particule vivante élémentaire et nous devons admettre que les organismes desséchés conservent ces quelques molécules d'eau indispensables. Dans quel état se trouvent donc les bactéries desséchées ? Nous savons que le refroidissement lent et progressif leur est nuisible, comme le réchauffement lent, l'expérience nous l'a récemment montré plusieurs fois. Ceci nous porterait à croire que l'albumine vivante de la bactérie n'a pas entièrement perdu son eau.

Ces quelques réflexions ne font que lever un coin du voile qui recouvre le problème de la résistance des bactéries au froid et à la dessiccation, sans expliquer le rôle protecteur des colloïdes, du serum en particulier. De cette profusion de faits, nous pouvons déduire que la matière vivante des bactéries se comporte de façon très particulière et garde sa vitalité dans les limites extrêmement larges. Cette résistance extraordinaire nous rappelle le souvenir de la panspermie d'Arrhenius ; ne permettrait-elle pas un transfert intersidéral des germes vivants ?

Pour terminer ce chapitre, on peut dire qu'actuellement la méthode de dessiccation par sublimation est parfaitement mise au point techniquement mais qu'elle pose des problèmes de science pure, qui méritent les recherches les plus approfondies et les plus intéressantes, surtout dans son application au maintien de la vitalité des microorganismes.

CONCLUSION

Sous le titre vaste et peut-être imprécis de « Les Collections microbiennes » nous avons essayé de réunir les faits intéressants l'histoire de ces collections, de leur extension mais aussi de leurs limites. Puis, après avoir insisté sur la nécessité de plus en plus grande d'une large coopération scientifique internationale, dans le domaine de la microbiologie en particulier, nous avons eu l'avantage de suivre la création du Centre de Collection de Types Microbiens de Lausanne.

Nous nous sommes attaqués ensuite au vaste problème de la conservation des bactéries en faisant tout d'abord une revue des nombreuses méthodes proposées, pour adopter finalement la méthode de la dessiccation des germes par la sublimation que

notre expérimentation nous a amené à étudier aussi bien au point de vue théorique que pratique et dont les succès permettent les plus grands espoirs tout en soulevant les questions les plus passionnantes.

Dans le monde de 1946, où tous les contacts sont à rétablir et à créer, où il importe de laisser une place à la confiance, le Centre de Collection pourra prendre une part active à l'œuvre de coopération scientifique internationale de l'après-guerre avec l'esprit qui anime par exemple les membres de « l'Organisation pour la Culture, les Sciences et l'Education des Nations Unies ». (U.N.E.S.C.O.).

Cet échange de matériel scientifique et d'informations ne peut que développer la bonne volonté et la compréhension entre les meilleurs éléments des diverses nations et contribuer à l'instauration de cette réciprocité qu'il faut souhaiter dans les sciences biologiques et partout ailleurs.

Bibliographie générale

1. d'Arsonval et Charrin 1894. Arch. de Phys. p. 335.
2. d'Arsonval et Bordas 1906. C. R. Acad. d. Sc. 142. 1058.
3. Arloing, Cornevin et Thomas 1887. Charbon symptomatique du bœuf 2^{me} éd. p. 135.
4. Barber 1908. J. Inf. Dis. 5. 379.
5. Bastin 1926. Bul. Am. Ass. Petr. Geol. 10.
6. Bastin 1930. Bul. Am. Ass. Petr. Geol. 14.
7. Becquerel 1926. Nature p. 60.
8. Becquerel 1931. Rev. de Trav. Cryptog.
9. Becquerel 1932. Bul. Inst. Inter. Froid. p. R. 81.
10. Beijerinck et Jacobson 1908. I. et Cong. Inter. Froid. Paris.
11. Belli 1902. R. Medica. janvier.
12. Bergey et al. 1939. Manual of Det. Bact. 5^{me} éd.
13. Bidault 1922. Rev. gen. du froid et Inst. frig. p. 56 et 246. C. R. Soc. Biol. t. 85. p. 1005.
14. Blanc 1943. Biol. Medic. vol. 33. No 10-11-12.
15. Bœrner, Flösdorf, Lukens 1941. Am. J. Cin. Path. 11. 122.
16. Boutaric 1926. Rev. Scientifique. Octobre p. 601.
17. Brooks et Hauford 1923. Rep. No. 17. Food. Invest. Board.
18. Brooks 1942. Suggest. for dev. of type cult. Collect.
19. Brooks 1943. Brit. Med. p. 284.
20. Brooks 1946. Résol. Cong. Sc. du cent. Col. Typ. Microb.
21. Buchanan 1925. Gener. Syst. Bact. Baltimore.
22. Carnot et Garnier 1902. C. R. Soc. Biol. 54. 748.
23. Castellani, Chalmers 1920. Ann. Inst. Past. 34. 600.
24. Cooper et Grabill 1939. J. of Lab. a. Clin. Med. 25. p. 184.
25. Craigie 1931. J. Immunol. 21. 417.
26. Dakomeit Centralbl. f. Bakt. I. Orig. 101. p. 290.
27. Daranyi, von Centralbl. f. Bakt. L. Orig. 108. p. 160.
28. de Jong Tijdsch. v. Vergelijkende geneesk. Enz. t. IX. f. 3.
29. Duclaux Ann. Inst. Past. 1889. 3. p. 78.
30. Duclaux 1885. Ann. de Chimie et de physique 6^{me} S.t.V.
31. Duclaux 1898. Traité de microbiologie. Paris. Masson. p. 355.
32. Della Torre 1923. Rev. Inter. d. Rens. agric. No. 2. p. 540.

33. Eisenberg Centralbl. f. Bakt. I. Orig. 3. p. 216.
34. Elser, Thomas
et Steffen 1935. J. Immunol. t. 28. p. 433.
35. Fay 1923. Journ. Dair. Sc. t. 6. No. 4. p. 283.
36. Finn 1932. Proc. Roy. Soc. LLL. 396.
37. Flosdorf et Mudd 1935. J. Immunol. 29. 389.
38. Flosdorf, Webster 1937. J. Biol. Chim. 121. 353.
39. Flosdorf et Mudd 1937. 2^{me} Cong. International de Microbiol.
40. Flosdorf et Mudd 1938. J. Immun. 34. 469.
41. Flosdorf et
Wenster 1938. Indish Rubber World 98. 33.
42. Flosdorf, Stokes
et Mudd 1940. J. Amer. Med. Assoc. 115. 1095.
43. Flosdorf et
Kimball 1940. J. Bact. 39. 225.
44. Flosdorf et al. 1940. American J. Clin. Path. 10. 339.
45. Flosdorf 1945. Brit. med. Journ. 17 février.
46. Flosdorf, Lewis,
Hull et Mudd 1945. J. of Immunology 50. p. 21.
47. Fleming 1932. J. Path. Bact. 35. 831.
48. Ficker 1908. Zeitschr. f. Hyg. t. 40. p. 367.
49. Frisch, von 1877. Sitz. er Wiener Acad.
50. Gautier 1945-46. Bull. Org. Hyg. S.d.N. vol. 12. ext. 1.
51. Ginter 1930. Bull. Amer. ass. petr. géol. lc.
52. Gøtz 1938. Biodinamoqué. No. 44.
53. Gehl, Anderson 1928. Centralblat. f. Bakt. 2.
54. Greaves 1942. J. Hygien. 41. 489.
55. Greaves et Adair 1939. J. Hygiène. 39. 413.
56. Greaves 1944. J. Am. Med. Ass. 124. 76.
57. Gorowitz et
Grimberg 1934. Bul. Inst. Internat. du froid.
58. Hainer 1933. J. Hyg. avril.
59. Hartley 1936. Bull. Trim. Org. Hyg. S.d.N. novembre.
59. a) Hartley,
Eagleton, Okell 1923. J. Path. and Bact. 26, 53.
59. b) Hartley 1931. Syst. of Bacteriology, 6, 250, Londres.
60. Hitchcock 1925. Descr. System. Bacter. New-York.
61. Henrici 1926. J. Inf. Dis. 38. 54.
62. Hauduroy 1938. Presse Med. 49.
63. Hauduroy 1939. C. R. Soc. Biol. t. 131. p. 692.
64. Hauduroy 1934. Rev. Microbiol. appliq. No 3 et 4, p. 174.
65. Hammer 1911. J. of med. Research. 24. f. 3. 527. p. 235.
66. Hitchens et
Parker Centralbl. f. Bakt. I. Ref. 59. 355.
67. Heim 1922. Lehrbuche des Bakt. 7. Aufl. 1922.
68. Harris et
Shackell 1911. Amer. J. Publ. Health. 1. 52.
69. Hill et Pfeiffer 1940. Ann. Intern. Med. 14. 201.
70. Hughes, Mudd et
Strecker 1936. Trans. Am. Neurol. Soc.
71. Hardy 1927. Cold Storage dec. p. 397.
72. Glover 1946. J. of Path. and Bact. 1. p. 111.

73. Jung 1935. Princip. géolog. du petrol p. 11.
74. Kirschner 1924. Geneesk. Tijdschr. v. Ned-Indië. t. 64. No. 2. p. 193.
75. Kurokawa, Ayahiro 1927. Tokohu J. of Med. exp. 9. p. 70.
76. Knox 1939. J. of Path. and Bact. vol. 49. No 3. p. 467.
77. Klepsoff 1895. Centrbl. f. Bakt. L. Orig. XV 11. p. 289.
78. Kallert 1923. Zeitschr. f. d. ges. Kälte. Ind. 7. p. 77.
1923. Zeitschr. f. d. ges. Kälte. Ind. 11. p. 17.
1924. Zeitschr. f. d. ges. Kälte. Ind. VIII. p. 96.
79. Kluyver et van Niel 1936. Zbl. Bakt. IIte. Abt. 94. 369.
80. Leslie 1811. Ann. de Chimie et Phys. 78. 177.
1812. Philos. Megazi 51. 4. 11. 421.
Zblt. f. Bakt. I. Orig. 81. p. 493.
81. Löwi 1941. Ann. Inst. Past. 67. p. 371.
82. Lépine et Sautter 1939. J. of Phys. Chemistry. vol. 43. No 7.
83. Luyet 1938. Bull. de la Murithienne. fasc. 56.
84. Luyet 1940. Science. Vol. 91. No 2359. p. 252.
85. Luyet 1939. Phys. Rev. Vol. 46. No 12. 1244.
86. Luyet 1937. Biodynamica No 29.
87. Luyet et Gahenio 1937. Biodynamica No 33. 1-92.
88. Luyet et Gahenio 1938. Biodynamica No 42, 1938.
89. Lamirand et Pariselle 1942. Cours de chimie. 3me éd. p. 145.
90. Leshchinskaya 1946. Am. Rev. Soviet. Med. vol. 3. 210-215.
91. Mudd et Flodorf 1936. J. Amer. Med. Ass. 107. 956.
92. Murata 1907. Cbl. f. Bakt. I. Orig. t. 43. p. 445.
93. Michael 1921. Cbl. f. Bakt. I. Orig. t. 86. p. 507.
94. Marmier 1918. Ann. Inst. Past. 32. p. 145.
95. Moret 1943. Paleont. végétal. Ed. Masson. p. 11.
96. Macovei 1938. Gis. de pétrole Ed. Masson p. 54.
97. Moran et Vickery 1929. Bul. Inst. Int. Froid. p. 159.
98. Moran 1926. Bul. Inst. Int. Froid. p. 1046.
99. Moran 1931. Cold Stora p. 262.
100. Migula 1894. Syst. der Bakterien. Bd. II. Jena.
101. Matisse 1919. Thèse fac. Sc. Paris.
102. Monvoisin 1921. Rev. gen. du froid et des inst. frig.
103. Mitchell 1887. The Medic. Records.
104. Meyer 1900. C. bl. f. Bakt. I. t. 28. p. 594.
105. Mac fayden 1900. The Lancet pp. 847 et 1130.
106. Novel 1943-4-5-6. Zyma Journal.
107. Novel 1945-46. Nature v. 155 p. 340 et 796.
v. 157 p. 27 et 360.
108. Novel 1943. Boissiera VII. Genève.
109. Orla-Jensen 1909. Zbl. Bakt. IIte. Abt. 22. 305.
110. Pasteur 1861. Exp. relat. à la gén. spontanée.
111. Pictet et Jung 1884. C. R. Acad. D. Sc. t. XC. VIII. p. 747.
112. Pictet 1893. Arch. des Sc. Phys. et Nat. Genève.
113. Prévot 1933. Ann. Sc. nat. 23.
114. Prévot 1938. Ann. Inst. Past. t. 60. No. 3. p. 285.
115. Prévot

116. Prévot 1940. Manuel de classification et de Détermination des bac. Anaérobies. Mas.
117. Penso 1946. Neget. 50. 49. 5050 Congrès du Cons. Sc. du C. de Col. de TM.
118. Puntoni 1923. Annali d'Igiene (Rome) No 3 et 5.
119. Puntoni 1927. Annali d'Igiene (Rome) No 7.
120. Polding 1943. J. of Path. and Bact. vol. 55 p. 502.
121. Pfeiffer 1943. Mechanical Engineering, May 43 p. 325.
122. Prucha et Brannon 1926. J. of Bact. p. 27.
123. Pauli 1932. Bol. sez. ital. Soc. Int. Microb. t. 4. No 9. p. 239.
124. Parish 1932. J. of Path. 35. p. 143.
125. Ravenel 1899. The medic. news. 10. VII.
126. Reuter 1919. Die Kälte Industrie p. 76.
127. Ruata 1928. 5me congrès int. du froid, vol. 4 p. 1.
128. Rayner 1943. J. of Path. and bact. vol 55 p. 373.
129. Rahn 1924. Zeitschr. f. des ges. Kälte Ind. II p. 15.
130. Richard 1945. Lettre du 25. 5. 45.
131. Remlinger et Boilly 1942. Ann. Inst. Past. p. 153.
- Remlinger et Boilly 1938. C. R. Soc. Biol. 129. 133.
- Remlinger et Boilly 1940. Inst. Past. 65. 130.
132. Suchard 1934. Thèse Ecole vétér. d'Alfort No 46.
133. Smith et Swingle 1904. VI^{me} reun. ann. de soc. amer. Bacter. Philadel.
134. Swift et Homer 1937. J. of Bakt. 35 p. 411.
145. Otten 1930. Centralbl. f. Bakt. Crig. 116 p. 199.
146. Sette 1927. Ann. d'Igien. 8. p. 542.
147. Swift 1921. J. of Exp. Med. t. 33 f. 1. p. 69.
148. Shattock et Dudgeon 1912. Proc. of the R. Soc. Londres, ser. B. vol. 85.
149. Shackell 1909. Amer. J. of Physiology t. 24 p. 325.
150. Soyka et Kral 1887. Cenbl. f. Bakt. Orig. I. p. 542.
151. Sawyer 1929. J. exper. Med. 50. 1.
152. Strumia 1943. J. lab. et clin. med. 28. 1140.
153. Trozky 1929. Laboratornaja Praktika. No 6.
154. Tuner et Fleming 1939. J. of Exp. Mnd. LXX. 6. p. 629.
155. Topley, Barnard, Wilson 1921. J. Hyg. comb. 20. 221.
156. Topley, Wilson 1946. Princip. of bac. and Imm. 1946. 3me ed.
157. Urbain, Thiery, et Courtade 1942. Ann. Inst. Past. p. 159.
158. Tammann 1898. Zeitsch. f. phys. Chemie 25. 472.
159. Vansteenbergh 1903. C. R. Soc. Biol. 55. 1646.
160. Verge et Coret 1941. Ann. Inst. Past. 67. 367.
161. Wollaston 1813. Phil. Trans. Royal. Soc. Londres 103. 71.
162. Ungermann 1918. Arb. Kaiserlich. Gesundheit amtet II. p. 180.

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 163. Wright | 1921. Cold Storage p. 75. |
| 164. White | 1937. Zbl. Bakt. II. te Abte. 96. 145. |
| 165. Wyss-Chodat | 1946. Les levures. Zyma Nyon. |
| 166. Wulff | 1909. Thèse à la fac. de med. vétérin, Berne. |
| 167. Wooley | 1939. Public Health report. V. 54. No 24,
p. 1077. |
| 168. Zirpolo | 1932. Bull. International du froid 1932 p. R. 87. |
| 169. Rogers | 1914. J. of Infect. Diseases vol. 14. p. 100. |
| 170. Velu, Pigoury,
Coustade | 1942. C. R. Soc. Biol. No 23-24. |
| 171. Suchard | 1934. Thèse. Dc. vétérinaire fac. Med. Paris. |
| 172. Macé | 1904. Bactériologie p. 302. |
| 173. Rahn | 1918. B. Inst. Past. p. 56. |
| 174. Soc. Microbiol. | 1945. Nature Vol. 155, p. 340. |
| Soc. Microbiol. | 1946. Nature Vol. 157, p. 360. |
| Soc. Microbiol. | 1946. Nature Vol. 157, p. 27. |
| Soc. Microbiol. | 1945. Nature Vol. 155, p. 796. |
| 175. Cent. Coll. Types
Microbiens | 1946. Resolutions, Commissions et Procès-
verbal du 1er Congrès du Conseil Scien-
tifique. |
| 176. Martin | 1896. J. Path. and Bact. 3. 507. |
| 177. Rosenan | 1905. Bull. No 21 Hyg. Lab. Wash. p. 50. |
| 178. Burrows et Cohn | 1918. J. Biol. Chem. 36. 587. |
| 179. Noguchi | 1907. J. Exp. Med. 9. 455. |
| | 1909. J. Exp. Med. 11. 392. |
| 180. Croigie | 1931. Brit. Journ. Exper. Path. 12. 75. |
| 181. Eagle, Strauss
et Steiner | 1935. Amer. Journ. Clin. Path. 5. 173. |
| 182. Rivers et Ward | 1935. Journ. Exper. Med. 62. 549. |
| 183. Dubos, Bacier | 1935. Journ. Exper. Med. 62. 271. |
| 184. Stokes et Mudd | 1934. Amer. J. Dis Chisd. 48. 1428. |
| 185. Stokes, Mc
Guimen, Mudd | 1935. Amer. J. Dis Chisd. 50. 535. |
| 186. Harris Eagle | 1935. J. Gen. Physiol. 19. 383. |

Bibliographie chronologique concernant les classifications

- | | |
|---------------------|---|
| Müller O. F. | 1786. Animalcula infusoria et marina. Hauniae |
| Bory de St. Vincent | 1824. Encyclopédie méthodique. |
| | 1826. Microscopiques. Dict. class. d'hist. nat.
10. 533. |
| Ehrenberg | 1838. Die Infusionsthierchen als vollkom.
Organ. Leipzig. |
| | 1836. Ann. Phys. Ser. 2. 8 : 217. |
| Dujardin | 1840. Cpt. r. Acad. Sc. II : 281. |
| | 1841. Hist. nat. des Zoophytes infusoires. |
| | 1841. Microsc. Journ. L : 53. |
| Perty | 1852. Zur Kenntniss kleinster Lebensformen. |
| Naegeli V. | 1857. Bericht über die Verhandlungen der bot.
Sect. der 33. Versammlung deutscher
Naturforscher und Arzt. Bot. Ztg. p. 760. |

- Rabenhorst 1864-65. *Elora Europea Algarum.*
 Davaine 1868. *Dict. encycl. des Sc. med.* Ser 1. 8. 21.
 Cohn 1872. *Untersuch über Bakterien.* Beitr. Biol. Pflanz 1 : 127.
 1875. *Untersuch über Bakterien.* Beitr. Biol. Pflanz 141 (3).
 1876. *Untersuch über Bakterien.* Beitr. Biol. Pflanz 2 : 249.
 Trevisan 1879. *Prime linee d'introd.allo stud.dei Batterj ital.* R. Reale. Inst. Lombardo. di Sc. e Let. Ser II. 12 : 13 et 133.
 1887. *Caratteri di alcuni nuovo generi di Batteriacea* R. Real. Inst. Lomb. Piso. p. 94.
 1889. *I. genera et la specie delle Batteriacee.* Milan.
 Luerssen 1879. *Botanik* 1 : 22.
 Winter 1880. *Dir Pilze.* Rabenhorst's flora 2. ed. vol. 1.
 Zopf 1885. *Die Spaltpilze.* 3me ed.
 Flügge 1886. *Die Microorganismen.* Leipsig.
 Schröter 1886. *Schizomycetes.* Cohn's Krypt. Flor. von Schlesien 3 : 136.
 De Bary 1884. *Vergl. Morph. u. Biol. d. Pilze, Mycetozoa, und Bakterien.*
 1886. *Vorlesungen über Bakterien.*
 Grove 1884. *A Synopsis of the Bacteria and yeast Fungi.*
 Tieghem, van 1884. *Bil. Soc. Bot. France* 27 : 174.
 Rosenbach 1884. *Mikroorganismen bei den Wund. Infektionskrankheit.*
 Maggi 1886. *Essai d'une class. protistologique des ferments vivants.* Jour. Microg. 10 : 80. 173. 327.
 Winogradsky 1888. *Beitr. zu. Morph. u. Physiol. d. Bakt.* Heft. 1. Leipsig.
 1892. *Arch. Sc. Biol. (St. Petersb.)* p. 87.
 Hansgirg 1888. *Oesterr. Bot. Ztschr.* 38 : 227, 263.
 Baumgarten 1890. *Lehrbuch der pathologischen Mykologie* Leipsig.
 Cornil and Babes 1890. *Bacteries.*
 Migula 1890. *Bakterienkunde für Landwirte.* Berlin.
 1894. *Über ein neues syst. der Bakterien* Arb. Bact. Inst. Karlsruhe 1 : 235.
 1897-1900. *Syst. der Bakterien.* Vol. 1 et 2.
 1895. *Schizomycetes.* Eugler et Prantl. Nat. Pflanzenfam. 20.
 Fischer 1895. *Jahrb. f. Wissensch. Bot.* Berlin.
 1897. *Lectures on Bacteria* 27 : 1-163.
 1903. *Vorlesungen über Bakterien* 2me ed.
 Lehmann et Neumann 1896. *Atlas u. Grundriss der Bakteriologie.* München.

- Chester 1897. Class. of the Schizomycetes. 9. Ann. Rep. Del. Coll. Agr.
1898. Class. of the Schizomycetes. 10. p. 100. p. 62.
1899. Class. of the Schizomycetes. 11. p. 52.
1901. Manual of Determinative Bacteriology.
1903. Class of the Schizomycetes, 15. Ann. p. 42.
- Kendall 1902. Proc. Amer. Pub. Health. Ann. 28 : 484.
- Matzuschita 1902. Bakteriologisches Diagnostik.
- Smith. Er. 1905. Bact. in. relat. to Plant diseases. Vol. 1. Carnegie Inst.
- Molish 1906. Bot. Ztg. Ab. 1. Orig. 64 : 223.
1907. Die Purpur Bakterien Iena.
1910. Die Eisenbakterien Iena.
- Swellengrebel 1907. Ann. d. Inst. Past. 21. 448, 562.
- Ellis 1907. Centralblatt. f. Bakt. Iena. Abt. 2. 19:516.
1909. Outlines of Bakteriology.
- Winslow, Broadhurst,
Jean, Buchanan, Krum-
wiede, Charles, Rogers,
Smith 1917 Journ. Bact. Balt. 552.
1920. J. Bact. Balt. 5-191-229.
- Winslow et Rogers 1905. Science. N. S. 21 : 669-672.
1906. Infect. Dis. Chicago 3 : 485-546.
- Winslow, Rothberg,
Persons 1920. J. Bact. Balt. 5 : 145-167.
- Winslow, Rogers 1908. The systematic relationships of the Cocaceae.
- Flügge 1908. Grundriss der Hygiene Ed. 6.
- Jordan 1908. General Bacteriology.
- Conn 1909. Agricultural Bacteriology Ed 2.
- Orla-Jensen 1909. Centralbl. f. Bakt. Abt. 2. 22 : 305.
Centralbl. f. Bakt. Abt. 2. 24 : 477.
1919. Mem. Acad. Roy. Sc. et lettres de Danemark. Copenhagen 5 (No 2) 81.
1921. J. Bact. Balt. 6 : 263.
- Heim 1911. Lehrbuch der Bakteriologie.
- Benecke 1912. Bau und Leben der Bakterien.
- Engler 1912. Syllabus der Pflanzenfam. Ed 7.
- Meyer A. 1912. Die Zelle der Bakterien. Iena.
- Löhnis 1913. Vorles. über Landwirtsch. Bakter.
- Vuillemin 1913. Genera Schizomycetum. Ann. Mycolo. Berlin. 11 : 546.
- Gonder 1914. Spironemaceae. Prowazek's Handbuch der pathog. Protoz. Lief. 6. p. 671.
- Buchanan 1915. J. Inf. Dis. Chicago 17 : 528.
1916. J. Bact. 1 : 591-596.
1917. J. Bact. 2 : 155-162.
1917. J. Bact. 2 : 347-350.
1917. J. Bact. 2 : 603-617.
1918. J. Bact. 3 : 27-61.

- Buchanan 1918. J. Bact. 3 : 175-181.
1918. J. Bact. 3 : 301-306, 403-406, 461-474, 541-545.
- Castellani, Chalmer 1919. Mn. of Trop. Med. 3. ed.
1920. Ann. Inst. Past. 34 : 600-621.
- Heller 1921. J. Bact. Balt. 6 : 521.
1922. J. Bact. Balt. 7 : 1 : 36.
- Einderlein 1917. Sitzber. Gesell. Naturf. Freunde. Berlin 309.
1925. Bakteriencyclogenic.
- Pringsheim 1923. Lotos 71. 357.
- Janke 1924. Allg. Techn. Mikrobiol. I. Teil. Dresden p. 63.
1926. Centr. f. Bakt. II. Abt. 66. 481.
1929. Oesten. Bot. Ztsch. 78. 108.
- Lehmann et Neumann 1926-27. Bakt. Diag. 2 vols. 7. ed. München
Breed. Eng. trans. New-York 1931.
- Pribram 1929. J. Bact. 18. 361.
1933. Klass. der Schizomycetes. Leipzig u. Wien p. 143.
- Prevot 1933. Ann. Sci. Nat. 10. ser. 15. 1. 260.
- Kluyer and Van Niel 1936. Centr. f. Bakt. II. Abt. 94. 369.
- Rahn 1937. Centr. f. Bakt. II. Abt. 96. 273.

Les collections microbiennes

Table des matières

	Pages
Introduction	5
Chapitre premier :	
Historique et réalisation récente	6
Chapitre second :	
Procédés de conservation des bactéries	22
Chapitre troisième :	
Conservation des bactéries par la dessiccation et le froid	38
Chapitre quatrième :	
Analyse expérimentale de la dessiccation par sublimation	48
Conclusion	57
Bibliographie	59

